

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAIANI CRISTINA SAVI

BIODIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS DA
PLANTA *Vochysia divergens* (CAMBARÁ)

CURITIBA
2011

DAIANI CRISTINA SAVI

BIODIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS DA
PLANTA *Vochysia divergens* (CAMBARÁ)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke

CURITIBA
2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Savi, Daiani Cristina

Biodiversidade e bioprospecção de actinomicetos da planta *Vochysia divergens* (Cambará). / Daiani Cristina Savi. – Curitiba, 2012.
106 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Chirlei Glienke

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

1. Actinomicetaceas 2. *Vochysia divergens* I. Título II. Glienke, Chirlei
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia
Básica.

CDD (20. ed.) 589.92



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

"Biodiversidade e Bioprospecção de Actinomicetos endofíticos da
planta *Vochysia divergens* (Cambará)"

por

DAIANI CRISTINA SAVI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Chirlei Gilenke (presidente)


Prof. Dr.ª Vânia Aparecida Vicente


Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito


Prof. Dr.ª Josiane Aparecida Gomes Figueiredo

Curitiba, 04 de novembro de 2011.

DEDICO

*À “Deus”
e aos meus familiares;
em especial a meus pais: Aldair e Catarina;
à minha irmã Daniela;
que sempre estiveram ao meu lado incentivando
e torcendo por minhas vitórias.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e especiais agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho:

À Prof^a Dr^a Chirlei Glienke, por acreditar e ajudar a construir o meu sonho, por toda a paciência e ensino. Mais que uma orientadora tornou-se uma amiga e um exemplo de vida, mostrando que os obstáculos são a base do crescimento. Impossível dizer o tamanho orgulho de tê-la como orientadora, e da gratidão por ter me recebido tão bem quando apareci do nada batendo em sua porta;

Às Profas Dras Lygia Vitória Galli-Terasawa, Vanessa Kava Cordeiro pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM;

À Prof^a Dr^a Giseli Klassen, por todo apoio e auxílio no desenvolvimento do trabalho e por toda a dedicação ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, meus sinceros agradecimentos;

Aos Professores do Mestrado em Microbiologia, que contribuíram para minha formação;

À Prof^a Dr^a Andréa E. M. Stingen pelo auxílio na prática de docência e pelo apoio, meus sinceros agradecimentos;

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Petzel-Erler, do Laboratório de Genética Molecular Humana e aos estagiários, por algumas facilidades concedidas neste trabalho;

Ao Departamento de Genética por permitir o uso de suas instalações;

Aos amigos do mestrado pelos momentos de convivência dentro e fora da Universidade;

À Dr^a Josiane Figueiredo, pelo auxílio na rotina do Laboratório, pelos ensinamentos, principalmente pela amizade e o apoio durante essa etapa, tornou-se um exemplo de perseverança e fé;

Ao mestrando Eduardo Goulin pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e compreensão;

Aos alunos de Pós-graduação do LabGeM, Andressa, Elizandro, Yuri, Fernando, Vivian, Carol, Renata, Ângela, Juliana Marta, Rayana, Josiele, Lisandra e Fabiana pela amizade e cooperação no trabalho diário dentro do laboratório;

Aos estagiários do LabGeM por bons momentos de convivência e ajuda naqueles momentos que tudo parecia impossível de ser realizado, em especial ao Douglas Adamoski;

Ao Maicon, pela ajuda e disponibilidade;

À Luciana Marques, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelas orientações e informações;

À minha família, em especial à minha mãe e meu pai, pelo amor, carinho, educação e incentivo em todos os momentos;

À amiga Paula Moiana da Costa, sem a qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho, agradeço a sua amizade e sua paciência;

Às amigas e companheiras de casa Fernanda, Ana Caroline, Rebeca e Julieta, pelo carinho e apoio quando as lágrimas vieram a cair;

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Um dos grandes problemas no mundo hoje é o aparecimento de linhagens bacterianas resistentes aos fármacos disponíveis na medicina e aos agrotóxicos aplicados no campo. Compostos químicos biologicamente ativos presentes em plantas utilizadas na medicina popular e em seus microrganismos endofíticos têm enriquecido as opções terapêuticas com novos fármacos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitumorais, e drogas para o controle de doenças vegetais. Em busca de novas drogas para a agricultura e de soluções para evitar o avanço das bactérias e fungos multiresistentes, o presente trabalho buscou o isolamento de actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*, e a bioprospecção de metabólitos secundários da mesma, como antimicrobiano. Esta é uma planta presente e predominante no Pantanal Sul Matogrossense, porém, não havia relatos da comunidade microbiana desta planta medicinal na literatura. Para isto foram realizados testes *in vitro* com os microrganismos e posteriormente com extratos hidrofóbicos e hidrofílicos contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219) e *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (ATCC 33591) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06), causador da doença Mancha Preta dos Citros. Dos 18 actinomicetos isolados sete apresentaram atividade contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* na técnica de cultura pareada. Estes actinomicetos foram utilizados em teste de metabólitos voláteis e não voláteis. Todos os microrganismos avaliados inibiram o fungo *P. citricarpa* pela produção de metabólitos não voláteis, e foram selecionados para a obtenção de metabólitos secundários pelo processo de fermentação. Os metabólitos secundários que ficaram na fração hidrofílica tiveram melhor resultado tanto na inibição do crescimento micelial (até 52%) e na produção de picnídios (até 70%) de *P. citricarpa*, sendo que o endofítico que melhor apresentou atividade foi o N5P3. Este actinomiceto foi confrontado com o fungo *P. citricarpa* em fruto e inibiu totalmente o crescimento micelial e produção de picnídios deste, inibindo o surgimento dos sintomas em frutos. Quando os extratos foram confrontados contra patógenos clínicos destacaram-se os isolados N4P61, N34C1 e N5P3, cujos extratos apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* (N4P61), *S. aureus* e *E. coli* (N34C1) e *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (N5P3). Por meio de seqüências da região 16S, foram identificados 10 isolados (N2P10, N3F10, A2F4, N3P10, N34C1, N35C1, N43B2, A4F10, N4P61 e N5P3) como pertencentes ao gênero *Microbispora*, e dois isolados (A3F5 e A1F10) como *Streptomyces sampsonii*. Os outros dois isolados foram identificados como *Micromonospora* sp. e não sendo semelhante com nenhum isolado disponível no banco de dados GenBank. Sugere-se o seqüenciamento multigênico para confirmação de sua identificação ou descrição como espécie nova. Este é primeiro relato da comunidade endofítica da planta *Vochysia divergens*, e o primeiro relato de um extrato endofítico capaz de inibir a expressão de sintomas da doença Mancha Preta dos Citros em frutos destacados. Destaca-se ainda, o grande potencial destes

actinomicetos endófitos no controle de patógenos humanos, como o *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente.

Palavra-chave: *Vochysia divergens*, actinomicetos, antimicrobianos, *Phyllosticta citricarpa*, *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente, controle biológico.

ABSTRACT

One of the biggest problems in the world is the emergence of drug-resistant strains in medicine and pesticides applied in the field. Active biologically chemical compounds present in plants, used in folk medicine, and its endophytic microorganisms have enriched the therapeutic options with new anti-inflammatory drugs, antimicrobial, antumor, and solutions to prevent the advance of multi-resistant bacteria and fungi, this article aimed the isolation of endophytic actinomycetes of the plant *Vochysia divergens*, and the bioprospecting of its secondary metabolites as an antimicrobial. This plant is present and prevalent in the Pantanal of Mato Grosso, however, there were no reports of the microbial community of this medicinal plant in the literature. For this, in vitro tests, were carried out with microorganisms and subsequently with hydrophobic and hydrophilic extracts against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) the yeast *Candida albicans* (ATCC 10231) and pathogen *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06), which causes citrus black spot disease. In the technique of paired cultures 7 of 18 actinomycetes isolated showed activity against the pathogen *Phyllosticta citricarpa*. These actinomycetes were used to test volatile and nonvolatile metabolites. All micro-organisms evaluated inhibited the fungus *P. citricarpa* due to the production of nonvolatile metabolites, and were selected to obtain secondary metabolites by fermentation. The secondary metabolites that were in the hydrophilic fraction had a much better result in the inhibition of mycelial growth (up 52%) and in the production of picnidis (70%) of *P. citricarpa*, and the endophytic that showed the best activity was the N5P3. This actinomycete was confronted with the fungus *P. citricarpa* in fruit and it totally inhibited the mycelial growth and production of picnidis, inhibiting the symptoms in fruits. When the extracts were compared against clinical pathogens the isolates N4P61, N34C1 and N5P3 stood out, whose extracts showed activity against *P. aeruginosa* and *C. albicans* (N4P61), *S. aureus* and *E. coli* (N34C1) and *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* (N5P3). Through sequences of 16S, we can classify 10 isolates (N2P10, N3F10, A2F4, N3P10, N34C1, N35C1, N43B2, A4F10, N4P61 and N5P3) as *Microbispora* sp. and the isolates (A3F5 and A1F10) as *Streptomyces sampsonii*. The other two isolates were identified as *Micromonospora* sp. and not being similar to any isolated available in the GenBank database. It is suggested multigenic sequencing to confirm its identification or description as new species. This is the first report of the plant endophytic community *Vochysia divergens*, and it is also the first report of an endophytic extract capable of inhibiting the expression of symptoms of citrus black spot on fruit detached. Besides the great potential of these endophytes actinomycete in control of human pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Vochysia divergens*, actinomycetes, antimicrobial, *Phyllosticta citricarpa*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, biological control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	18
2.2 ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS.....	20
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	22
2.4 <i>VOCHYSIA DIVERGENS</i> E O PANTANAL SUL MATOGROSSENSE.....	23
2.5 CONTROLE BIOLÓGICO.....	25
2.7 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	30
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	35
4.2 ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS	35
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ACTINOMICETOS.....	36
4.3.1 COLORAÇÃO DE GRAM	36
4.3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	37
4.3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
4.3.2.2 PCR ESPECÍFICA PARA ACTINOMICETOS	37
4.3.2.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	40
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	44
4.4.1 ANTAGONISMO CONTRA O FUNGO FITOPATOGÊNICO <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i>	44
4.4.1.2 TESTE PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS	45
4.4.1.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	46
4.4.1.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS	46
4.4.1.4.1 OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	46
4.4.1.4.2 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	47
4.4.1.4.3 FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i> EM FOLHAS AUTOCLAVADAS	48
4.4.1.4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS NA FORMAÇÃO DA MASSA CELULAR E PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM FRUTOS CÍTRICOS DESTACADOS	48
4.4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA PATÓGENOS DE INTERESSE CLÍNICO POR BIOAUTOGRAFIA.....	49
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50

5 RESULTADOS.....	50
5.1 ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS	50
5.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS.....	51
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE GRAM 51	
5.2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR ESPECÍFICA PARA ACTINOMICETOS	52
5.2.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO 16S.....	53
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	58
5.3.1 ANTAGONISMO CONTRA O FITOPATÓGENO <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i>	58
5.3.1.1 ANTAGONISMO CONTRA <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i> ATRAVÉS DA CULTURA PAREADA	58
5.3.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DOS ACTINOMICETOS ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS VOLÁTEIS	58
5.3.1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DOS ACTINOMICETOS ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NÃO VOLÁTEIS.....	58
5.3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	61
5.3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA <i>VOCHYSIA DIVERGENS</i>62	
5.3.3.1 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i>.....	62
5.3.3.2 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i> EM FOLHAS DE <i>CITRUS SINENSIS</i> AUTOCLAVADAS	65
5.3.3.3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR E FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i> EM FRUTOS.....	67
5.3.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS NA INIBIÇÃO DAS BACTÉRIAS <i>STAPHYLOCCOCUS AUREUS</i>, <i>ESCHERICHIA COLI</i>, <i>STAPHYLOCCOCUS AUREUS</i> METICILINA RESISTENTE, <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> E A LEVEDURA <i>CANDIDA ALBICANS</i>.....	68
6 DISCUSSÃO	72

6.1 ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS.....	72
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS.....	73
6.3 ANTAGONISMO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS FRENTE AO FITOPATÓGENO PHYLLOSTICTA CITRICARPA.....	76
6.4 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS.....	78
6.4.1 OBTENÇÃO DOS METÁBOLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOMICETOS DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS.....	78
6.4.2 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICO DA PLANTA VOCHYSIA DIVERGENS FRENTE AO FITOPATÓGENO PHYLLOSTICTA CITRICARPA.....	79
6.4.3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS NA INIBIÇÃO DAS BACTÉRIAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINA RESISTENTE, PSEUDOMONAS AERUGINOSA E A LEVEDURA CANDIDA ALBICANS.....	82
7 CONCLUSÕES GERAIS	86
8 PERSPECTIVAS.....	87
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- *VOCHYSIA DIVERGENS* (SETA) DA REGIÃO DO AMOLAR, UTILIZADA NO ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS.. 35**
- FIGURA 2 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DO ISOLADO N35C1 APRESENTANDO COLORAÇÃO DE GRAM VARIÁVEL 51**
- FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DO ISOLADO N3P102 APRESENTANDO COLORAÇÃO DE GRAM POSITIVO. 52**
- FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR FAMÍLIA ESPECÍFICA. A. PCR COM OS INICIADORES SM6F E SM5R B. PCR COM OS INICIADORES 21F E 959R..... 53**
- FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S DO RDNA (900 PB), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFITICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *MICROBISPORA* E MEMBROS DA FAMÍLIA *STREPTOSPORANGIACEAE*. 55**
- FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S DO RDNA (900 PB), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *MICROMONOSPORA* E MEMBROS DA FAMÍLIA *MICROMONOSPORACEAE* 56**
- FIGURA 7 – ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S DO RDNA (900 PB), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *STREPTOMYCESE* E MEMBROS DA FAMÍLIA *STREPTOMICETACEAE* 57**
- FIGURA 8 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DO ACTINOMICETO N5P3, INIBINDO O CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *PHYLLOSTICTA CITRICARPA* (LGMF06) APÓS 14 DIAS DE INCUBAÇÃO..... 63**
- FIGURA 9 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DO ACTINOMICETO *MICROBISPORA* SP. N5P3 NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO *PHYLLOSTICTA CITRICARPA* (LGMF06) EM FOLHAS DE *CITRUS SINENSIS* AUTOCLAVADAS..... 66**
- FIGURA 10 – FOTOMICROGRAFIAS DE INDUÇÃO DE LESÕES DE MANCHA PRETA DOS CITROS EM FRUTOS DESTACADOS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO DO ISOLADO *MICROBISPORA* SP. N5P3 APÓS 14 DIAS DE INCUBAÇÃO.. 70**
- FIGURA 11 – AÇÃO DO EXTRATO DO ACTINOMICETO *MICROBISPORA* SP. N5P3, INIBINDO O CRESCIMENTO DA LEVEDURA *CANDIDA ALBICANS*, PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA 71**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- QUADRO 1** - OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTERIA..... **39**
- QUADRO 2** – SEQUENCIAS DE LINHAGENS ESPÉCIES TIPO UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS GENBANK **41**
- TABELA 1** – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELO MÉTODO DE PAREAMENTO, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA **59**
- TABELA 2** – MÉDIA DE CRESCIMENTO (CM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA **60**
- TABELA 3** – MÉDIA DE CRESCIMENTO (CM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA **61**
- TABELA 4** – RENDIMENTO EM GRAMAS DOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*..... **62**
- TABELA 5** – MÉDIA DE CRESCIMENTO (CM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA..... **60**
- TABELA 6** – MÉDIA DE CRESCIMENTO (CM) PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÍLICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA..... **65**
- TABELA 7** – NÚMERO DE PICNÍDIOS E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, EM MEIO AGAR ÁGUA EM FOLHAS DE LARANJA AUTOCLAVAS APÓS 28 DIAS. **67**
- TABELA 8** – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÓBICO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, SOBRE BACTÉRIAS E LEVEDURA DE INTERESSE CLÍNICO **69**

TABELA 9 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, SOBRE BACTÉRIAS E LEVEDURA DE INTERECE CLÍNICO PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA. 70

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA *et al.*, 2004). Os microrganismos endofíticos foram descritos inicialmente por Bary em 1866, mas, somente há poucas décadas, foi demonstrado que o interior de raízes, folhas e sementes de plantas podem servir como reservatório para abrigar estes microrganismos (AZEVEDO *et al.*, 2000; ARNOLD, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (MURRAY *et al.*, 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN & SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL *et al.*, 1999) e diversos outros antibióticos (BI *et al.*, 2011).

Entre os actinomicetos, em especial o gênero *Streptomyces*, é bastante conhecido devido a sua enorme capacidade de produzir metabólitos secundários, fornecendo ao mercado farmacêutico as mais variadas opções terapêuticas. Taechowisan, Peberdy e Lumyong (2003) observaram a atividade antifúngica de actinomicetos (*Streptomyces* sp.) de proveniência endofítica de várias plantas contra *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum*. Nishimura *et al.* (2002) isolaram actinomicetos (*Streptomyces* sp.) endofíticos da planta *Kalmia latifolia* com provável atividade de biocontrole das doenças fúngicas que acometem este tipo de planta. Os fitopatógenos testados foram *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp., *Pestalotiopsis sydowiana*, *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp. O antibiótico canamicina foi extraído de um isolado endofítico do gênero *Streptomyces* endofítico de *Grevillea pteridifolia* por Zin (2007). Os mesmos autores observaram a atividade de estreptomicetos endofíticos de plantas presentes na Península de Malay, na França, contra *Phytophthora*

erythroseptica, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Rhizoctonia solani*.

A espécie *Vochysia divergens*, popularmente conhecida como cambará, possui grande relevância econômica para a população pantaneira, na produção de madeira, é também empregado, de forma considerável, como planta medicinal (folha e casca) sendo um recurso terapêutico contra doenças respiratórias e problemas gastrintestinais. Com a casca do caule prepara-se um xarope com mel, famoso por ser expectorante, curar tosse, gripe e, também, utilizado no tratamento de apendicites. A partir das folhas são preparados chás usados contra asma, gripe e distúrbios digestivos (POTT e POTT, 1994).

Apesar do interesse econômico e ampla utilização medicinal do cambará pela população, existem pouquíssimos relatos sobre a composição química e atividade biológica de *V. divergens*. No que diz respeito às atividades biológicas relacionadas à espécie, foi verificado que o extrato etanólico das cascas de *V. divergens* apresentou atividade bactericida frente à *Staphylococcus aureus* e atividade antinociceptiva (CORRÊA, 2007).

Atualmente, a Mancha Preta do Citros (MPC), vem se alastrando por todas as regiões citrícolas, causando prejuízos em inúmeras regiões produtoras de citros no mundo, incluindo Brasil, Austrália e África do Sul (ROSSETTO, 2010). A MPC prejudica tanto o consumo do mercado interno onde a aparência do fruto é de vital importância, como para exportação, visto que esta doença tem sido designada como uma barreira fitossanitária, principalmente no mercado Europeu, comprometendo a exportação brasileira de fruta fresca (FUNDECITRUS, 2003). É considerada uma doença quarentenária A1 para os países da União Européia (WULANDARI *et al.*, 2009).

Descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália a MPC é causada pelo fungo patogênico *Guignardia citricarpa* Kiely (forma anamórfica *Phyllosticta citricarpa* Van Der Aa). Atualmente encontra-se em pomares brasileiros, prejudicando o comércio nacional e principalmente internacional (GOES *et al.*, 2005).

Neste contexto, visando a busca de novas drogas para a agricultura e de soluções para evitar o avanço das bactérias e fungos multiresistentes o presente trabalho buscou o isolamento e identificação de actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens* e sua bioprospecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos Endofíticos

O Brasil detém cerca de 20% de toda a biodiversidade mundial, a maior do Planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA, 2004).

O estabelecimento das plantas em seus respectivos habitats envolve a sua capacidade em interagir com diferentes espécies de seres vivos. Entre estas associações, destacam-se as mutualísticas com microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destes, outros microrganismos, chamados de endofíticos têm recebido especial atenção devido à sua importância em relação a diferentes espécies vegetais (AZEVEDO *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Neste contexto, o emprego de microrganismos em práticas agrícolas tem aumentado substancialmente nos últimos anos, tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas. Outras aplicações, eles se constituem em substitutos de produtos químicos, favorecendo desta maneira a preservação do ambiente (SOUZA, 2004).

Os microrganismos endofíticos foram descritos inicialmente por Bary em 1866, mas, somente há poucas décadas, foi demonstrado que o interior de raízes, folhas e sementes de plantas podem servir como reservatório para abrigar estes microrganismos (SOUZA, 2004).

Pela ausência de conhecimento sobre o papel biológico destes microrganismos, alguns termos foram utilizados para defini-los. Sturdy e Cole (1974) os denominaram de microrganismos endógenos, enquanto Gardener *et al.* (1982) os consideraram como bactérias resistentes do xilema. Segundo Kloepper e Beuchamp (1992), o termo mais adequado é “endofítico”, que pode ser definido como “microrganismos que ocorrem no interior dos tecidos de plantas e aparentemente não causam sintomas de doença ao hospedeiro”.

Hallmann *et al.* (1997) sugeriram uma definição mais ampla, considerando microrganismos endofíticos aqueles isolados de tecidos vegetais desinfectados que não causam aparentemente danos a planta.

A ocorrência de microrganismos endofíticos é muito ampla e vem sendo observada em diferentes plantas, algas marinhas, musgos e pteridófitos (PETRINI, 1986), coníferas (BERNSTEIN e CARROLL, 1977), palmeiras tropicais (RODRIGUES e SAMUELS, 1990) e folhas largas (FISHER e PETRINI, 1990), apresentando certa preferência por certos órgãos da planta, principalmente em partes do hospedeiro que se encontram sadias.

Há registros de bactérias endotíticas isoladas de uma ampla variedade de plantas incluindo tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (GERMIDA, 1998), batata (*Solanum tuberosum* L.) (STURZ, 1999), trigo (*Triticum aestivum* L.) (COOMBS, 2003; SICILIANO, 1998); milho (*Zea mays* L.) (MCINROY, 1995), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (MCINROY, 1995), óleo de colza (*Brassica napus* L.) (GERMIDA, 1998), arroz selvagem (*Oryza officinalis* L.) (GARBENA, 2001), e plantas de citros (ARAUJO, 2001; ARAUJO, 2002), com atividade antagônica a fitopatógenos. Os endófitos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatógenos, que lhes causam doenças. Os endófitos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seu potencial na produção de metabólitos de interesse econômico.

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (RODRIGUES e DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993). Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (CORDEIRO NETO e DIETRICH, 1992). Os fungos estimulam a produção de micotoxinas, metabólitos secundários que podem

causar doenças em humanos e outros animais (CLAY, 1988; D'MELLO e MACKONALD, 1997).

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (MURRAY *et al.*, 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN e SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL *et al.*, 1999) e diversos outros antibióticos. Relatos como o do taxol, inicialmente isolado de *Taxus brevifolia* e, em seguida, de diversos endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser melhor explorado.

O manejo de doenças de plantas por meio do controle biológico é uma alternativa na transição agroecológica, contribuindo, para a eliminação do uso de fungicidas e bactericidas. A superfície das plantas é colonizada por uma ampla variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, denominados de microrganismos epifíticos. Dentre estes, encontram-se microrganismos fitopatogênicos, saprófitos e também antagonistas que podem ser utilizados como biocontroladores de doenças de plantas. Perreira (2008) isolou fungos endofíticos de *Citrus*, e observaram que os mesmos inibiram os fitopatógenos *Phyllosticta* spp., e *Colletotrichum* spp., o uso de alternativas ecologicamente corretas para o controle de fitopatógenos.

2.2 Actinomicetos endofíticos

O primeiro actinomiceto isolado de tecidos internos de plantas foi do gênero *Frankia*, que é um actinomiceto fixador de nitrogênio de leguminosas (PROVOROV, 2002). A biodiversidade de actinomicetos endofíticos é imensa, e já foram isolados de uma ampla variedade de espécies de plantas, que vão desde plantas cultivadas, como trigo, arroz, batata, cenoura, tomate e frutas cítricas (NEJAD *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2002; COOMBS *et al.*, 2003; SURETTE *et al.*, 2003; SESSITISHC *et al.*, 2004; TIAN *et al.*, 2007;

VELAZQUEZ *et al.*, 2008), entre diferentes espécies de árvores lenhosas, samambaias e musgos (TAECHOWISAN *et al.*, 2003; ZIN *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010). Em geral, o gênero mais frequente foi *Streptomyces* spp. seguido de *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Nocardia* e *Streptosporangium*.

Tan *et al.* (2006) isolaram 619 actinomicetos de diferentes culturas de tomate, os quais foram classificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. De 36 espécies de plantas medicinais da Tailândia, Taechowisan *et al.* (2003) isolaram 330 amostras pertencentes a quatro gêneros (*Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* e *Micromonospora*).

Lee *et al.* (2008) isolaram 81 actinomicetos endofíticos de raízes de couve chinesa, incluindo oito gêneros sendo *Microbispora* spp. o mais comum, seguido de *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. Quando foi feita a relação caule folhas e raízes, as raízes apresentaram o maior número de isolados, seguido do caule e folhas, respectivamente. Castilho *et al.* (2003) isolaram de uma planta medicinal chinesa, 560 colônias que apresentaram características morfológicas de actinomicetos. As linhagens foram isoladas da raiz (58,2%), do caule (27,8%) e folhas (14%), e apresentaram como gênero mais isolado *Microbispora*, seguido de *Streptomyces*.

Silva *et al.* (1995) verificaram a ocorrência de 53 actinomicetos endofíticos dos quais 22 foram isolados das folhas e 31 das raízes de milho (*Zea mays* L.). O gênero *Microbispora* foi o mais freqüente (62%), seguido de *Streptomyces* e *Streptosporangium*. Maitan (1998) isolou sete actinomicetos endofíticos da planta medicinal *Solanum lycocarpum*, que ocorre no Estado de Goiás. Alguns actinomicetos apresentaram atividade antibiótica e foram identificados como dos gêneros: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microlunatus* e *Luteococcus*.

Matsuura (1998) em sua pesquisa isolou de folhas e raízes do feijão Caupi (*Vigna unguiculata*) 31 linhagens de actinomicetos endofíticos, entre os quais predominou o gênero *Streptomyces* (39%), seguido de *Nocardioopsis* (25%). Araujo *et al.* (1996) isolaram 53 actinomicetos de folhas e raízes de milho (*Z. mays* L.) cultivado no Campus da UFPE, e cerca de 40% dos isolados apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e *C. albicans*.

2. 3 Metabólitos secundários

Os actinomicetos são responsáveis pela produção de uma gama diversificada de metabólitos secundários com propriedades medicinais, incluindo, antibióticos, antitumorais, agentes imunossupressores e hormônios de crescimento (FIEDLER *et al.*, 2005; STROBEL *et al.*, 2003; STROBEL *et al.*, 2004), que desempenham um papel importante na indústria farmacêutica. Os metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzidos pelo gênero *Streptomyces* são bastante conhecidos e já forneceram ao mercado farmacêutico varias opções terapêuticas.

Taechowisan, Peberdy e Lumyong (2003) observaram a atividade antifúngica de actinomicetos (*Streptomyces* sp.) de proveniência endofítica de várias plantas contra dois fungos patogênicos, *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum*. Estreptomicetos são a fonte de cerca de 80% dos antibióticos utilizados terapeuticamente, ou seja, aminoglicosídeos, cefamicinas, polienos, tetraciclinas, macrolídeos, benzoporinas e antibióticos triazólicos (EL-GENDY *et al.*, 2008; WATVE *et al.*, 2001).

Nishimura *et al.* (2002) isolaram actinomicetos (*Streptomyces* sp.) endofíticos da planta *Kalmia latifolia* com provável atividade de biocontrole das doenças fúngicas que acometem este tipo de planta, os fitopatógenos testados foram *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp., *Pestalotiopsis sydowiana*, *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp. A Canamicina, um antibiótico, foi extraída de um *Streptomyces* sp. endofítico de *Grevillea pteridifolia*, por Castilho *et al.* (2003). Zin *et al.* (2007) observaram a atividade de estreptomicetos endofíticos de plantas etnobotânicas presentes na Península de Malay, na França, contra *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Rhizoctonia solani*.

Outros compostos bioativos obtidos de estreptomicetos endofíticos são: as anguciclinas com atividade contra *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (MARUNA *et al.*, 2010), os compostos ativos irumamicina, X-14952B e 17-hidroxi-venturicidina A, todos extraídos do mesmo isolado de *Streptomyces* sp.

(FIGUIRA *et al.*, 2005), os macrolídeos 11-O-Monometil e 11,11-O-Dimetilelaiophilins ativos contra bactérias Gram-positivas e alguns fungos (RITZAU *et al.*, 1998), o 8-hidroxiquinolina com atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (NARAYANA *et al.*, 2008).

De acordo com Valois *et al.* (1996), actinomicetos endofíticos mostraram atividade antagônica para uma variedade de fitopatógenos, como *Alternaria solani*, *Verticillium*, *Fusarium*, e *Macrophomina*. Verma *et al.* (2009) observaram que cerca de 60% dos actinomicetos isolados mostraram atividade de amplo espectro contra bactérias e fungos. De acordo com Minuto *et al.* (2006), *S. griseoviridis* desempenha um papel importante no controle de doenças de tomate e também na estimulação do crescimento. Uma linhagem de *Micromonospora* sp. isolada de plantas aparentemente saudáveis de tomate mostrou uma forte reação inibitória contra *F. oxysporum* e *F. lycopersici* (HASEGAWA *et al.*, 2006). Segundo Hamdali *et al.* (2008), uma linhagem de *Micromonospora aurantiaca* reduziu o impacto causado por *P. ultimum* em plantas de trigo, quando suas sementes foram cobertas com esporos do actinomiceto.

Dois novos compostos chamados 2-formylpyrrole-4-acrilamida (1) hitreptazolin (2) foram isolados do caldo de fermentação de *Streptomyces* BY-4, um actinomiceto residente no intestino de *Odontotermes formosanus*. Os compostos isolados foram testados para as atividades citotóxicas e antimicrobianas (BI *et al.*, 2011). Segundo Wang *et al.* (2011) poliéters lonóforos, são uma classe única de policetídeos com largo espectro de atividade e potência excelente para o controle de bactérias resistentes aos medicamentos e parasitas, e são produzidos exclusivamente por actinomicetos. Pristinamicina, produzida por *S. pristinaespiralis* PR11, é um antibiótico estreptogramina consistindo de dois compostos quimicamente relacionados pristinamicina I e II. Os derivados semissintéticos desses compostos são utilizados na medicina humana como agentes terapêuticos contra cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente “MRSA” (WAST *et al.*, 2011).

2.4 *Vochysia divergens* e o Pantanal Sul Matogrossense

O Pantanal é uma planície de inundação periódica, pertence à Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai que tem uma área estimada em 361.666 km², integrante da Bacia do Prata. O rio Paraguai atravessa a região de norte a sul, comandando toda a rede de drenagem da região, formada pelos rios Cuiabá, São Lourenço, Itiquira, Correntes, Taquari, Negro, Aquidauana e seus afluentes. Está localizado no centro da América do Sul, ocupa parte do território brasileiro e pequena parte do território paraguaio e do boliviano, com uma área total de 147.574 km² (SILVA e ABDON 1998; SILVA *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2006).

Cunha (2006) estudando a distribuição de espécies vegetais em áreas do Pantanal verificou que há influência do pulso de inundação sobre a distribuição de espécies nas áreas alagáveis, sendo que este fator pode atuar como estressor para as comunidades de plantas bem como promotor da diversidade de habitats e espécies.

Entre as espécies vegetais que respondem muito bem ao pulso de inundação do Pantanal está a planta *Vochysia divergens*, popularmente conhecida na região como cambará. De acordo com Pott (1994) esta é uma espécie amazônica considerada invasora nas regiões de solos argilosos, que tolera muito bem a inundação.

O cambará é uma árvore cuja altura pode variar de 7 a 25 m, e densa copa. O caule é cilíndrico com diâmetro à altura do peito de 30-50 cm. As folhas são simples, coriáceas, glabras, brilhantes na parte superior e opacas na parte inferior, com 7 a 13 cm de comprimento e aproximadamente três cm de largura. Suas inflorescências são recemosas, terminais com 20 a 28 cm de comprimento, apresentando flores de cor amarela. Os frutos apresentam-se em forma cápsulas oblongas, glabros com 4 a 5 sementes (LORENZI, 1998).

No Pantanal Mato-Grossense podem ser observadas extensas áreas onde *V. divergens* apresenta-se como espécie mono dominante, originando áreas denominadas cambarazais. Estudos fitossociológicos, por meio de levantamento aéreo realizados por Silva (2000), revelaram que a área de cambarazal ocupava 3,1% da área do Pantanal Mato-Grossense. A espécie *V. divergens* possui relevância econômica para a população pantaneira. Da árvore, a madeira é utilizada para fabricação de canoas e construção de ranchos. Além disso, sua madeira é considerada própria para tábuas, muito

utilizada na marcenaria, produção de compensado e celulose. Outro aspecto importante da utilização de *V. divergens* pela população ribeirinha é a exploração da espécie como “produto florestal não madeirável”.

O cambará é empregado, de forma considerável, como planta medicinal (folha e casca) sendo um recurso terapêutico contra doenças respiratórias e problemas gastrintestinais. Com a casca do caule prepara-se um xarope com mel famoso por ser expectorante, curar tosse, gripe e, também, utilizado no tratamento de apendicites. A partir das folhas são preparados chás usados contra asma, gripe e distúrbios digestivos (POTT e POTT, 1994).

Apesar do interesse econômico e ampla utilização medicinal do cambará pela população, existem pouquíssimos relatos sobre a composição química e atividade biológica de *V. divergens*. Os poucos estudos fitoquímicos encontrados para a espécie estão relacionados com o isolamento e caracterização de um esteróide e cinco triterpenos do extrato etanólico das cascas (CORRÊA, 2007). O conhecimento de rotas biossintéticas de classes químicas aperfeiçoa a detecção, identificação e o processo de isolamento das substâncias de interesse.

No que diz respeito às atividades biológicas relacionadas à espécie, foi verificado que o extrato etanólico das cascas de *V. divergens* apresentou atividade bactericida frente à *S. aureus* e antinociceptiva, de forma dose-dependente, em camundongos submetidos a testes nociceptivos com formalina (dor e inflamação) e contorções abdominais induzidas por ácido acético (CORRÊA, 2007).

2.5 Controle biológico

A aplicação de fungicidas, apesar de ser relativamente barata e comumente utilizada no controle de fitopatógenos, é altamente tóxica ao homem e ao meio ambiente, e ainda pode perder sua efetividade pela seleção de resistência desses patógenos ao pesticida, por isso a busca de novas alternativas para evitar este tipo de doença deve ser valorizada (LIU *et al.*, 2001).

Duas alternativas vêm sendo estudadas, a produção e extração de metabólitos secundários por endófitos, já que eles comprovadamente possuem

a propriedade de inibir o crescimento de diversos microrganismos e o controle biológico (LIU *et al.*, 2001).

O controle biológico é uma medida não-química de contenção de um fitopatógeno que já teve relatos de ser mais efetiva que o controle químico, porém, ela é ocasionalmente inadequada e a variação da eficácia pode ser alta (GUETSKY *et al.*, 2002). Este tipo de controle utiliza-se da propriedade dos endófitos em penetrar na planta e se disseminarem, assim como os fitopatógenos (ARAÚJO *et al.*, 2002). Os mecanismos pelos quais o controle biológico atua incluem a indução de resistência da planta, a competição por nutrientes e a produção de metabólitos secundários (GUETSKY *et al.*, 2002).

Segundo Bettiol (1991), doença é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção e que por consequência, apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para o autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

Cook e Baker (1983) definem controle biológico como “*a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, realizada por/ou através de um ou mais organismos que não o homem*”. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: antibiose, predação, indução de resistência da planta hospedeira, micoparasitismo, produção de enzimas e toxinas, colonização sistêmica da planta hospedeira, competição de nutrientes e sítios de colonização e liberação de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular (BETTIOL, 1991).

Atualmente, diversos microrganismos são utilizados como agentes no controle de fungos fitopatogênicos, entre eles podem ser citadas espécies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pythium*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Agrobacterium* e *Streptomyces* (MELO e AZEVEDO, 1998).

O antagonismo entre microrganismos foi relatado em diversos estudos (MARTINS-CORDER e MELO, 1998; AMORIM e MELO, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; MONTEALEGRE *et al.*, 2003).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares. Os principais métodos de seleção de microrganismos *in vitro* descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, líquido metabólico, etc. (MARIANO, 1993). A seleção de microrganismo *in vivo* é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, dentre outros. A seleção de antagonistas baseia-se em evidências de que o organismo candidato interfere de algum modo, no desenvolvimento do patógeno. Tal interferência implica na destruição ou inibição deste como descreve Rubini *et al.* (2005).

Após o isolamento e seleção de um antagonista, o emprego de microrganismo como agente de controle biológico de fitopatógenos, ocorre principalmente por meio do tratamento das sementes, do solo, das partes aéreas das plantas e pós-colheita.

2.6 Mancha Preta do Citros

De origem asiática, a laranja foi trazida para as Américas na época dos descobrimentos, por volta de 1500. A citricultura ficou entregue a própria sorte e a laranja espalhou-se pelo mundo sofrendo mutações e dando origem a novas variedades até o século XIX, quando as teorias de Mendel e Darwin foram disseminadas e as pesquisas e experimentos para aprimorar variedades de laranja tiveram início na Europa (ABECITRUS, 2011).

Quarenta ou cinqüenta séculos depois de sua presumível domesticação, os pomares mais produtivos, resultantes de uma agricultura estruturada, estão nas regiões de clima tropical e subtropical. A laranja tem seu maior volume de produção nas Américas: São Paulo no Brasil e Flórida nos Estados Unidos (ABECITRUS, 2011).

A economia brasileira, até o início da década de 90, apresentava-se praticamente fechada ao comércio internacional. Com a abertura econômica e a globalização, houve um aumento substancial na movimentação de mercadorias, inclusive de produtos de origem vegetal. Incrementou-se também

o turismo internacional, e esta associação de fatores, aliados à falta de estrutura da defesa fitossanitária, propiciaram um aumento do risco de introdução de pragas exóticas (FAO *et al.*, 2002).

A citricultura constitui uma grande parte da estrutura sócio-econômica do Brasil, sendo considerada como uma das mais típicas atividades agro-industriais do país, com uma área de aproximadamente 615 mil hectares em sua maioria no Estado de São Paulo, distribuídos em 330 municípios e em 29.000 propriedades. A citricultura gera, neste Estado, aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos assim como responde por significativos valores, em divisas, oriundos da exportação de frutas frescas e do produto industrializado, representado por suco concentrado, pectina e óleos essenciais (AGRIANUAL, 2000). Sendo assim nas últimas décadas o Brasil assumiu a liderança mundial na produção de laranjas, com 20.594 milhões de toneladas na safra de 2004/2005, seguido dos Estados Unidos com 11.894 milhões de toneladas, não havendo perspectivas a curto e médio prazo, de mudanças nessa realidade (ABECITRUS, 2011).

O Brasil é responsável por 35% da produção mundial de laranja, ocupando, desde o início da década de 90, o lugar de maior produtor seguido pelos Estados Unidos (20%), México (6%), China (4%) e Espanha (4%). No Brasil, a maioria dos Estados produz laranja e outros tipos de frutas cítricas, mas São Paulo é responsável por 73% da área colhida no país, maior produtor nacional, com volume que supera 400 milhões de caixas (BOTEON, 2011). Cerca de 70% da produção brasileira é destinada à industrialização (FAO *et al.*, 2002).

Apesar da importância na economia brasileira, a citricultura já passou por muitas dificuldades, na maioria das vezes, relacionadas às doenças, que são: a leprose, causada por vírus transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*; morte súbita dos citros, doença de causa desconhecida detectada pela primeira vez em 2001; cancro cítrico e clorose variegada dos citros causados respectivamente pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* e *Xylella fastidiosa*; e aquelas de natureza fúngica, como gomose (*Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*), rubelose (*Corticium salmonicolor*), podridão floral (*Colletotrichum acutatum*), melanose (*Diaphorte citri*) e a Mancha Preta dos Citros (MPC) (FUNDECITRUS, 2003).

A MPC, vem se alastrando por todas as regiões citrícolas, causando prejuízos em inúmeras regiões produtoras de citros no mundo, indo até a Austrália e África do sul. A MPC prejudica tanto o consumo do mercado interno onde a aparência do fruto é de vital importância, como para exportação, visto que a Mancha Preta tem sido designada como uma barreira fitossanitária, principalmente no mercado Europeu, comprometendo a exportação brasileira de fruta fresca (FUNDECITRUS, 2003).

A MPC foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália (FAWCETT, 1936). Foi constatada na África (Moçambique, Zimbabwe, Swazilândia e África do Sul), na Ásia (China, Filipinas, Taiwan e Indonésia), na Oceania (Austrália) e na América do Sul (Argentina, Brasil e Peru) (FEICHTENBERGER, 1996; KOTZÉ, 1996). No Brasil a Mancha Preta foi descrita, no ano de 1940, mas ficou esquecida por não ter sido mencionada sua importância em termos de perdas, devido a uma temporária redução do inoculo resultante da epidemia da tristeza dos citros, que redundou na eliminação de aproximadamente 11 milhões de árvores nas décadas dos 30 a 40 (GOES, 2002).

Foi descrita em pomares comerciais em São Gonçalo e Itaboraí, no Estado do Rio de Janeiro e nos fins da década de oitenta, surgiu de forma epidêmica na região citrícola do Vale do Caí, no Rio Grande do Sul. Já no estado de São Paulo foi detectada pela primeira vez em 1992, infectando plantas de limoeiros verdadeiros e laranjeiras-doces de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (GOES, 2002) e, atualmente, vem se alastrando nas regiões citrícolas paulistas (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

A MPC afeta todas as variedades de laranjeiras doces (ALCOBA *et al.*, 2000; AGUILAR- VILDOSO *et al.*, 2002) e a expressão de seus sintomas está relacionada com a época de maturação das variedades, sendo tanto maior quanto mais madura estiver a fruta (FEICHTENBERGER, 1996). O período de latência varia entre quatro e seis meses. Altas temperaturas e intensa radiação solar são condições ambientais que favorecem a expressão dos sintomas (KOTZÉ, 1963). Com isto, alguns autores atribuem à maior intensidade da doença em variedades tardias, ao maior período de exposição de seus frutos a condições favoráveis para a expressão dos sintomas (FEICHTENBERGER, 1996). Entretanto, outros autores atribuem à maior expressão de sintomas de

Mancha Preta em variedades tardias à sua maior suscetibilidade (KIELY, 1948; GOES, 2002).

Contudo, os sintomas da MPC ficam restritos ao flavedo dos frutos (CARDOSO FILHO, 2003), não havendo interferência em sua qualidade interna, onde frutos doentes podem, portanto, ser utilizados no processamento para produção de suco (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002).

2.7 Resistência Bacteriana

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentado nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar. A qual está aumentando em todo o mundo, devido à facilidade de disseminação de patógenos resistentes (TENOVER *et al.*, 2001).

O primeiro relato de resistência a uma droga antimicrobiana data de 1907, realizado por Paul Ehrlich, que registrou o aparecimento de tripanossomatídeos resistentes ao quimioterápico "rosanilina" tão logo este foi desenvolvido (LOWY *et al.*, 2003).

No século passado, as doenças infecciosas representavam a principal causa de morte em hospitais de todo o mundo, onde muitos dos pacientes internados com infecção bacteriana aguda morriam por falta de opção terapêutica (EICKHOFF *et al.*, 1998).

A resistência bacteriana pode definir-se como a capacidade de um microrganismo crescer na presença de um antimicrobiano em doses terapêuticas. Desde 1928 em que Alexander Fleming descobriu a penicilina até a época atual o uso da antibioticoterapia tem permitido mudar o curso das enfermidades infecciosas. Os antibióticos estão presentes na natureza como produtos metabólicos de alguns microrganismos de maneira que a resistência aos mesmos pode surgir como um fenômeno natural que permite sua sobrevivência. A primeira descrição de betalactamase em uma bateria foi descrita em *E. coli*, e se deu antes do primeiro betalactâmico (a penicilina) ser empregado de forma generalizada, na prática médica (PLATELL *et al.*, 2011).

Desde a década de 40, a partir da descoberta das penicilinas naturais, surgiram vários antimicrobianos com espectros de ação cada vez mais amplos que trouxeram grandes avanços no tratamento das doenças infecciosas. Contudo, a ampla utilização destes fármacos forneceu também o desenvolvimento da resistência bacteriana, uma vez que os antimicrobianos afetam tanto o paciente que faz uso deles, como também, de maneira mais ampla, o meio ambiente, interferindo na flora de outros pacientes e das pessoas que com eles entram em contato (WATTAL *et al.*, 2005).

Com a descoberta das penicilinas e sua utilização no tratamento das infecções acreditou-se que as doenças infecciosas deixariam de ser um problema na prática médica. Pouco tempo após o início da sua utilização, em 1946, cerca de 5% dos *S. aureus* isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949, esta resistência podia ser notada em 29% dos estafilococos isolados em hospitais, em 1950, atingia 50% e, em 1959, era cerca de 80% em hospitais americanos (EICKHOFF *et al.*, 1998).

Em 1963, Weinstein e colaboradores isolaram um novo antibiótico de largo espectro a Gentamicina, a qual foi produzida por espécies de actinomicetos pertencentes ao gênero *Micromonospora*, a qual apresentou grande importância no tratamento de *E. coli* resistente à penicilina (WEINSTEIN *et al.*, 1963).

A prevalência de germes multirresistentes varia segundo o local do estudo, com taxas entre 58% e 71% de *P. aeruginosa* resistentes à ciprofloxacino, 43% e 59% de MRSA e de 7% a 63% das mostras de *E. coli* resistentes à gentamicina. Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, estudos têm estabelecido o importante papel que o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos representa para a ocorrência de germes multirresistentes no ambiente hospitalar (JACOBY *et al.*, 2008). Estas infecções levam ao aumento significativo da morbidade e mortalidade, implicando no prolongamento da internação e aumento dos custos com os tratamentos (JACOBY *et al.*, 2008).

Outros antibióticos foram sendo sintetizados, mas sempre surgiam bactérias que apresentavam resistência aos novos medicamentos. Através de mecanismos de troca genética, muitas bactérias tornam-se resistentes a várias classes de antimicrobianos (WATTAL *et al.*, 2005). A OMS

estima que para a descoberta de um novo antibiótico, para combater bactérias multiresistentes leva um tempo de 10 anos a um custo de R\$ 1,88 bilhão (FLECK, 1999).

Na década de 1970, dada a preocupação com o crescente aumento da resistência bacteriana a antibióticos beta-lactâmicos, duas grandes frentes de pesquisa foram organizadas, uma na busca de novos compostos antibióticos resistentes a beta-lactamase e a segunda na descoberta de substâncias inibidoras de beta-lactamases para serem administradas em conjunto com antibióticos beta-lactâmicos. Como resultado da primeira frente de pesquisa, foi descoberta a cefamicina C de culturas de *Streptomyces* sp. por pesquisadores da Merck. A descoberta da cefamicina representou um marco no desenvolvimento dos antibióticos. Pela primeira vez, uma molécula com atividade antibacteriana mostrava-se resistente a beta-lactamases (ELANDER, 2003). Paralelamente, um grupo de pesquisadores da Beecham Pharmaceutical Research Divison elaborou um programa de seleção e isolamento de culturas microbianas produtoras de inibidores de beta-lactamases. Uma das culturas que apresentou resposta positiva foi a do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). Este novo composto foi denominado Ácido clavulânico (READING e COLE, 1977).

A resistência a medicamentos antimicrobianos ainda hoje, permanece como um dos principais problemas na área da saúde moderna, com o impacto sobre as opções de tratamento, mortalidade e controle da infecção, além de questões econômicas. A introdução de novos antimicrobianos tem sido consistentemente seguida pelo surgimento de bactérias resistentes. Ao longo do tempo, o *Staphylococcus aureus* adquiriu uma ampla gama de mecanismos de resistência aos antimicrobianos e os isolados Meticilina resistente (*MRSA*) tornaram-se os mais comuns causadores de infecções relacionadas a bactérias na Europa (UEKOTTER, 2011).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa, e muitas vezes resistente a vários antibióticos, conseqüentemente, classificou-se como pertencendo as "superbactérias", devido à sua enorme capacidade de adquirir resistência encontrada principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs). Ela demonstra sensibilidade diminuída à maioria dos antibióticos, devido à baixa permeabilidade da membrana externa e mecanismos adaptativos,

podendo facilmente atingir resistência clínica. As formas de resistência adaptativa podem ser desencadeadas por a exposição a antibióticos ou adaptações complexas, tais como o crescimento do biofilme (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011).

Outro antibiótico de extrema importância sintetizado por actinomicetos foi a Vancomicina a qual foi isolada de *Streptomyces orientalis*. A Vancomicina é indicada principalmente no tratamento de infecções graves provocadas por cocos Gram-positivos resistentes aos antibióticos que são comumente empregados. Principalmente em caso de infecção por *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente, incluindo abscesso cerebral, meningite, septicemia bacteriana e endocardite (LEVINE, 2006).

Novos agentes antimicrobianos são extremamente necessários para combate do número crescente de cepas resistentes aos antibióticos de microorganismos patogênicos. Produtos naturais continuam sendo a fonte mais propícia de antibióticos. É amplamente aceito que actinobactérias são produtores prolíficos de compostos bioativos naturais.

Tiwari *et al.* (2011) argumentam que a probabilidade de descobrir um novo composto tendo uma estrutura química nova pode ser aumentada se isolar e fazer triagem de gêneros raros de microorganismos. Triagem de actinomicetos raros e seus gêneros previamente sub-representados em ambientes inexplorados em condições de triagem natural do produto é uma forma de conseguir isso. Actinomicetos raros são geralmente considerados como as cepas de actinomicetos cuja frequência de isolamento é muito menor do que as cepas isoladas de *Streptomyces* por métodos convencionais. Muitos ambientes naturais estão ainda inexplorados ou pouco explorados e, portanto, podem ser considerados como um recurso fecundo para o isolamento de microorganismos menos explorados (TIWARI *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Isolar e identificar linhagens endofíticas de actinomicetos de plantas de *Vochysia divergens*, bem como testar sua atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar linhagens de actinomicetos endofíticos de plantas sadias de *V. divergens*;

- Identificar macro e micromorfologicamente linhagens de actinomicetos endofíticos isoladas de *V. divergens*;

- Realizar a caracterização molecular dos principais gêneros isolados com sequenciamento da região 16S-23S do rDNA;

- Testar a atividade antagônica dos actinomicetos endofíticos e seus extratos *in vitro* e *in fruto* contra o fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa*;

- Avaliar atividade dos extratos dos actinomicetos endofíticos contra bactérias e leveduras de interesse clínico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

As folhas de *Vochysia divergens* foram coletadas a partir de 10 exemplares da planta, de aproximadamente seis metros de altura, presente no Pantanal do Mato Grosso do Sul, em duas regiões, Nhecolândia e Amolar (FIGURA 1). Foram realizados dois isolamentos, sendo que em cada isolamento foram utilizadas 10 plantas, de cada planta foram analisados 10 fragmentos de folhas e 10 de pecíolos, totalizando assim 4000 partes analisadas.

Para coleta do material biológico, deu-se preferência para folhas sem marcas, arranhaduras ou ferimentos, baseando-se na metodologia de Petrini (1986).



FIGURA 1- *Vochysia divergens* (seta) DA REGIÃO DO AMOLAR, UTILIZADA NO ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS.
FONTE: O autor (2011).

4.2 Isolamento de actinomicetos endofíticos

Para eliminar os microrganismos epifíticos, a superfície das folhas foram lavadas em água corrente e mergulhadas em frascos com água destilada

esterilizada por 1 minuto, em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 10 minutos, etanol 70% por 30 segundos e por último, em água destilada esterilizada por 6 minutos. Após a assepsia, pequenos fragmentos medindo aproximadamente 8 x 8 mm foram plaqueados em meio AC (10,0g de amido (ou glicerol), 0,3g de caseína, 2,0g de KNO₃, 2,0g de NaCl, 2,0g de K₂HPO₄, 0,05 g de MgSO₄.7H₂O, 0,01g de FeSO₄.7H₂O, 18,0g de ágar e água destilada q.s.p. 1000,0mL com pH 7,0 – 7,2), acrescido de tetraciclina (100 µg/mL), para inibir o crescimento bacteriano, e Cicloheximida (50 µg/mL), para inibir o crescimento fúngico, facilitando assim o isolamento de actinomicetos (GUIMARÃES, 1998). As placas foram incubadas a 28°C por 30 dias, e o crescimento foi verificado diariamente para garantir o repique dos microrganismos que se desenvolveram. Para o cálculo da frequência de isolamento foi usado uma relação de 100% para o número de fragmentos plaqueados em relação ao número de actinomicetos isolados

Os endofíticos obtidos foram acondicionados nos meios apropriados, sem a presença de antibióticos, sob-refrigeração (aproximadamente 4°C). Os estoques foram mantidos com repiques a cada quatro meses para evitar perda de amostra.

4.3 Identificação dos actinomicetos

4.3.1 Coloração de Gram

As colônias com características de actinomicetos, após a incubação, foram repicadas em meio AC por meio da técnica de esgotamento. Posteriormente realizou-se a coloração de Gram para verificar a pureza da cultura e se os microrganismos eram Gram positivos, ou Gram variáveis e ainda se os mesmos apresentavam uma forma filamentosa ou se fragmentavam em bacilos, cocos ou cocobacilos, características de actinomicetos.

4.3.2 Caracterização molecular

4.3.2.1 Extração de DNA

Os actinomicetos endofíticos isolados com foram submetidos à caracterização molecular. A extração do DNA genômico, foi feita utilizando o kit Comercial Ultraclean Microbial (MoBio), seguindo as normas do fabricante.

A concentração de DNA foi estimada por meio do equipamento NanoDrop, e de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando como padrão de peso molecular o DNA do fago λ (Gibco) clivado com *HindIII* com concentração conhecida. Após eletroforese, o gel foi corado com Sybr Green, observado sobre transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentador.

4.3.2.2 PCR específica para actinomicetos

Para identificação preliminar das famílias de actinomicetos, foi realizada uma reação de PCR específica para actinomicetos, desenvolvida para actinomicetos de regiões marinhas por Maldonado (2005), o qual desenvolveu pares de oligonucleotídeos para as principais famílias de actinomicetos: *Amycolatopsis* spp., *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardia* spp., *Streptomycetaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Thermomonosporaceae*. Os iniciadores escolhidos para determinação de família, através de PCR específica estão descritos no QUADRO 1.

A amplificação para as amostras de actinomicetos seguiu as condições descritas por Maldonado *et al.* (2005) contendo: 50 ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 1,5 U de *Taq* polimerase, 0,5 μ M de oligonucleotídeos iniciadores (25 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ em um volume final de 50 μ L. A reação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 65°C e 1 min a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C para os oligonucleotídeos iniciadores Sm6F e Sm5R. Para os oligonucleotídeos iniciadores 21F e 959R as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 58°C e 1 min a 72°C, e

extensão final de 10 min a 72°C. Para os oligonucleotídeos iniciadores M2F e A3R as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 2 min a 68°C, e extensão final de 10 min a 72°C. Para os oligonucleotídeos iniciadores AMY2 e ATOP as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 25 ciclos de 60 s a 95°C, 60 s a 65°C e 60 s a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C.

Para confirmação de presença da amplificação no tamanho esperado para cada par de iniciadores, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% e corados com *Sybr Green* e documentados em fotodocumentador DigDoc.

QUADRO 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTERIA

Target Taxa	Primer	Seqüência 5'-3'	Amplificação (pb)	Referência
<i>Actinobacteria</i>	S-C-Act-0235-a-S-20 S-C-Act-0878-a-A-19	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG CCGTACTIONCCCCAGGCGGGG	640	N/A
<i>Amycolatopsis</i> spp.	AMY2 ATOPb	GGTGTGGGCGACATCCACGTTGT GCTGGTACAGAGGGCTGCGATAC	450	Tan (2006)
<i>Micromonosporaceae</i>	M2F A3R	AGAAGAAGCGCCGGCC CCAGCCCCACCTTCGAC	1000	Pisano <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudonocardia</i> spp.	AMP2 AMP3	GTGGAAAGTTTTTTTCGGCTGGG GCGGCACAGAGACCGTGGAAT	640	Desconhecido
<i>Streptomycetaceae</i>	Sm6F Sm5R	GGTGGCGAAGGCGGA GAACTGAGACCGGCTTTTTGA	600	Monciardini <i>et al.</i> (2002)
<i>Streptosporangiaceae</i>	21F 959R	GACGAARNTGACGTGTA CGTTGCGTCTAATTAAGCAA	500	Hayakawa e Nonomura 1987
<i>Thermomonosporaceae</i>	T3F T8R	GGGAGAATGGAATTCCC CCCCACCTTCGACC	800	Athalye <i>et al.</i> (1985)
Universal	27f 152Sr	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AAGGAGCTCWTCCARCC	1500	N/A

N/A, Não aplicável.

Fonte: MALDONADO *et al.*, 2005

4.3.2.3 Reação de sequenciamento

A reação de amplificação foi realizada nas condições descritas por Lee *et al.* (2008), para os iniciadores universais para 16S, amplificando a região entre 634 e 1541 do gene 16S rDNA. Os oligonucleotídeos foram designados 9F (5' – GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC). As condições da reação de sequenciamento foram as seguintes: 98 °C por 4 min; 30 ciclos de 98 °C por 10 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; temperatura final de 72 °C por 4 min (LEE *et al.*, 2008). A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* modelo *Mastercycler Gradient*. Para confirmação de presença do DNA na amostra, 5 µl, foram aplicados em gel de agarose 1,0%. A purificação do produto de PCR foi realizada com acetato de amônio e etanol PA e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 15 µL de água ultra-pura esterilizada.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado 1µL do DNA a 10ng/µl, 1µL do *Premix Ready Reaction* (Applied), 3 µl do Tampão de sequenciamento, 1µL dos iniciadores separadamente, completando o volume de 10µL com água ultrapura autoclavada. A reação seguiu as seguintes condições: desnaturação 96°C por 15 s, anelamento 50°C por 45 s e 60°C por 90 s.

A purificação da reação de sequenciamento foi feita adicionando 40µL de isopropanol 75%, posteriormente homogeneizou, e foi deixado em temperatura ambiente por 20 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos e removeu-se o isopropanol. Posteriormente, adicionou-se 200µL de etanol 70% e centrifugou 13000 rpm por 5 minutos, então o etanol foi removido e deixado o tubo secar a temperatura ambiente. Após a secagem as amostras foram ressuscitadas em formamida (Applied). A leitura da reação de sequenciamento foi feita em eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo ABI31330.

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7 (THOMPSON *et al.*, 1994).

Com posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALLI, 1999).

As sequências foram então utilizadas para análise filogenética utilizando o método de Bayesiana utilizando-se o software MrBayes versão 2.0 (HUELSENBECK, 2004). Para mesclar e sumarizar as árvores de consenso, foi utilizado o software SumTrees com vários processos paralelos, utilizando-se o pacote DendroPy versão 3.7.0 (SUKUMARAN, 2010). Para as análises filogenéticas foram utilizadas diversas sequências disponíveis no banco de dados genbank (QUADRO 2) do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

QUADRO 2 – SEQUÊNCIAS DE LINHAGENS ESPÉCIES TIPO UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS GENBANK

ESPÉCIE	LINHAGEM	CÓDIGO DE ACESSO
<i>Microbispora mesophila</i>	JCM 3151	AF002266.1
<i>Microbispora rosea</i>	IFO 14044	D86936.1
<i>Microtetraspora africana</i>	IFO 14745	U48842.1
<i>Microtetraspora angiospora</i>	IFO 13M	U48843.1
<i>Microtetraspora fastidiosa</i>	IFO 14680	U48844.1
<i>Microtetraspora ferruginea</i>	IFO 14094	U48845.1
<i>Microtetraspora fusca</i>	IFO 13915	U48973.1
<i>Microtetraspora glauca</i>	IFO 14671	U48974.1
<i>Microtetraspora helvata</i>	IFO 14681	U48975.1
<i>Microtetraspora niveoalba</i>	IFO 15239	U48976.1
<i>Microtetraspora polychroma</i>	IFO 14345	U48977.1
<i>Microtetraspora pusilla</i>	IFO 14684	U48978.1
<i>Microtetraspora recticatena</i>	IFO 14525	U48979.1
<i>Microtetraspora roseola</i>	IFO 14685	U48980.1
<i>Microtetraspora salmonea</i>	IFO 14687	U48982.1
<i>Microtetraspora spiralis</i>	IFO 14097	U48983.1
<i>Microbispora rosea</i>	ATCC 1544	U48984.1
<i>Microbispora aerata</i>	JCM 3021	U48984.1
<i>Microbispora parva</i>	IFO 14876	U48985.1
<i>Microbispora thermodiastatica</i>	IFO 14041	U48986.1
<i>Microbispora thermorosea</i>	ATCC 33326	U48987.1
<i>Microbispora amethystogenes</i>	ATCC 2709	U48988.1
<i>Microbispora chromogenes</i>	ATCC 27099	U48989.1
<i>Microbispora diastatica</i>	ATCC 1545	U48990.1
<i>Streptosporangium fragile</i>	IFO 14311	U48992.1
<i>Streptosporangium longisporum</i>	IFO 13141	U48993.1
<i>Streptosporangium nondiastaticum</i>	IFO 13990	U48994.1

<i>Streptosporangium pseudovulgare</i>	IFO 13991	U48995.1
<i>Streptosporangium roseum</i>	JCM 3005	U48996.1
<i>Streptosporangium violaceochromogenes</i>	JCM 3281	U48997.1
<i>Streptosporangium viridialbum</i>	JCM 3027	U48998.1
<i>Streptosporangium vulgare</i>	IFO 13985	U48999.1
<i>Actinomadura atramentária</i>	IFO 14695	U49000.1
<i>Actinomadura citrea</i>	IFO 1467	U49001.1
<i>Actinomadura coerulea</i>	IFO 14679	U49002.1
<i>Actinomadura cremea</i> subsp. <i>Rifamycini</i>	IFO 14183	U49003.1
<i>Actinomadura echinospora</i>	IFO 14042	U49004.1
<i>Actinomadura fulvescens</i>	IFO 14347	U49005.1
<i>Actinomadura kijaniata</i>	IFO 14229	U49006.1
<i>Actinomadura luteofluorescens</i>	IFO 14095	U49008.1
<i>Actinomadura macra</i>	IFO 13057	U49009.1
<i>Actinomadura rugatobispora</i>	IFO 14102	U49010.1
<i>Actinomadura verrucospora</i>	IFO 14382	U49011.1
<i>Catellatospora ferruginea</i>	IMSNU 22007	AF152108
<i>Catellatospora citrea</i> subsp. <i>Methionotrophica</i>	IMSNU 22008	AF152107
<i>Catellatospora citrea</i> subsp. <i>Citrea</i>	IMSNU 22006	AF152106
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	IFO1234	D85474.1
<i>Micromonospora lupini</i>	Lupac 14	AJ783996.1
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	Lupac 09	AJ783993.1
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	WA201	AJ626950.1
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168	X92599.1
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904	X92618.1
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909	X92623.1
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903	X92617.1
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363	X92603.1
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913	X92625.1
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM 46123	X92629.1
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906	X92620.1
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398	AJ560635.1
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 43026	AJ784008.1
<i>Actinoplanes brasiliensis</i>	DSM 43151	X93185
<i>Actinoplanes regularis</i>	DSM 43805;	X93188
<i>Dactylosporangium roseum</i>	DSM 43916	X93194
<i>Dactylosporangium thailandense</i>	DSM 43158	X92630
<i>Dactylosporangium vinaceum</i>	DSM 43823	X93196
<i>Dactylosporangium matsuzakiense</i>	DSM 43810	X93193
<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	DSM 43157	X93191
<i>Dactylosporangium fulvum</i>	DSM 43917	X93192
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151	X92628
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819	X92610
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803	X92631
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813	X92604
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816	X92607
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026	X92594

<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818	X92609
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817	X92608
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171	X92601
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143	X92598
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821	X92611
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912	X92624
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868	X92613
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 22003	AF152109
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	BTG4-1	AB193559
<i>Micromonospora auratinigra</i>	TT1-11	AB159779
<i>Micromonospora chayaphumensis</i>	MC5-1	AB196710
<i>Micromonospora krabiensis</i>	MA-2	AB196716
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	AM105	AY561829
<i>Micromonospora ebúrnea</i>	LK2-10	AB107231
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	DSM 44151	AB241454
<i>Micromonospora coxensis</i>	WA201	AB241455
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	TJ2-2	AB275607
<i>Pilimelia terevasa</i>	DSM 43040	X93190
<i>Pilimelia anulata</i>	DSM 43039	X93189
<i>Streptomyces yanii</i>	IFO 14669	AB006159
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	ATCC 700248	AB026221
<i>Streptomyces misakiensis</i>	ATCC14900	AB217605
<i>Streptomyces nodosus</i>	ATCC14899	AF114033
<i>Streptomyces albiflavinigier</i>	NRRL B-1356	AJ391812
<i>Streptomyces phaeogriseichromatogenes</i>	NRRL 2834	AJ391813
<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	NRRL B-5799	AJ391814
<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i>	ISP 5182	AJ391815
<i>Streptomyces auratus</i>	NRRL 8097	AJ391816
<i>Streptomyces griseinigier</i>	NRRL B-1865	AJ391818
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	CBS 101.34	AJ494864
<i>Streptomyces albus</i>	DSM 40313	AJ621602
<i>Streptomyces purpurogeneiscleroticus</i>	DSM 43156	AJ621604
<i>Streptomyces violens</i>	DSM 40597	AJ621605
<i>Streptomyces olivaceiscleroticus</i>	DSM 40595	AJ621606
<i>Streptomyces Níger</i>	DSM 43049	AJ621607
<i>Streptomyces sclerotialus</i>	DSM 43032	AJ621608
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	DSM 40545	AJ621609
<i>Streptomyces rimosus</i>	DSM 41429	AJ621610
<i>Streptomyces tubercidicus</i>	DSM 40261	AJ621612
<i>Streptomyces catenulae</i>	DSM 40258	AJ621613
<i>Streptomyces atroolivaceus</i>	LMG 19306	AJ781320
<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	LMG 19316	AJ781321
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	LMG 19344	AJ781322
<i>Streptomyces purpureus</i>	LMG 19355	AJ781324
<i>Streptomyces lateritius</i>	LMG 19372	AJ781326
<i>Streptomyces albosporeus</i>	LMG 19403	AJ781327
<i>Streptomyces erythrogriseus</i>	LMG 19406	AJ781328

<i>Streptomyces globosus</i>	LMG 19896	AJ781330
<i>Streptomyces graminearus</i>	LMG 19904	AJ781333
<i>Streptomyces lavendofoliae</i>	LMG 19935	AJ781336
<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	LMG 19941	AJ781339
<i>Streptomyces laurentii</i>	LMG 19959	AJ781342
<i>Streptomyces morookaense</i>	LMG 20074	AJ781349
<i>Streptomyces libani</i>	LMG 20087	AJ781351
<i>Streptomyces lienomycini</i>	LMG 20091	AJ781353
<i>Streptomyces nojiriensis</i>	LMG 20094	AJ781355
<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	LMG20096	AJ781364
<i>Streptomyces torulosus</i>	LMG 20305	AJ781367
<i>Streptomyces spororaveus</i>	LMG 20313	AJ781370
<i>Streptomyces variegatus</i>	LMG 20315	AJ781371
<i>Streptomyces viridobrunneus</i>	LMG 20317	AJ781372
<i>Streptomyces violaceorubidus</i>	LMG 20319	AJ781374
<i>Streptomyces aurantiacus</i>	LMG 19358	AJ78138
<i>Streptomyces alboniger</i>	ATCC 12461	AY845349
<i>Streptomyces viridodiataticus</i>	IFO 13106	AY999852
<i>Streptomyces viridiviolaceus</i>	IFO 13359	AY999854
<i>Streptomyces tanashiensis</i>	IFO 12919	AY999856
<i>Streptomyces aureocirculatus</i>	IFO 13018	AY999861
<i>Streptomyces psammoticus</i>	IFO13020	AY999862
<i>Streptomyces violaceochromogenes</i>	IFO 13100	AY999867
<i>Streptomyces scabiei</i>	ATCC49173	D63862
<i>Streptomyces acidiscabies</i>	ATCC49003	D63865
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	ATCC12309	D63867
<i>Streptomyces neyagawaensis</i>	ATCC27449	D63869
<i>Streptomyces eurythermus</i>	ATCC14975	D63870
<i>Streptomyces sampsonii</i>	ATCC25495	D63871
<i>Streptomyces tendae</i>	ATCC19812	D63873
<i>Streptomyces himastatinicus</i>	ATCC27654	EF408736
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	DSM 4044	Z68094
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	DSM 40443	Z68096
<i>Streptomyces thermolineatus</i>	DSM 41451	Z68097
<i>Streptomyces macrosporus</i>	DSM41452	Z68099

Fonte: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.1 Antagonismo contra o fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa*

4.4.1.1 Teste da Cultura Pareada

A avaliação inicial da atividade antagonista dos isolados endofíticos contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* foi realizado utilizando a Técnica de Cultura Pareada (MARIANO, 1993). A técnica de pareamento foi realizada em placas de petri contendo meio de cultura BDA (Agar Batata Dextrose), onde foi plaqueado um disco (Ø 6 mm) da cultura do fungo *P. citricarpa* e no lado oposto, um disco com o isolado endofítico a ser avaliado, ambos a 1,0 cm da borda. Após o pareamento, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas durante 14 dias em estufa, a 28°C. Os experimentos foram realizados em triplicata. O controle foi realizado em placas contendo apenas disco do fitopatógeno. A avaliação foi realizada mediante a medição do diâmetro da colônia do fungo *P. citricarpa* comparando com o controle. Discos contendo os isolados endofíticos e do fitopatógeno,, foram obtidos de colônias crescidas em meio BDA, durante sete dias, incubadas em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação para determinar a porcentagem de inibição do crescimento foi feita medindo o diâmetro das colônias e posteriormente subtraindo o diâmetro do disco de micélio inicial (QUIROGA *et al.*, 2001) e calculado pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (PI\%)} = \frac{\mathbf{Dc} - \mathbf{Dt}}{\mathbf{Dc}} \times 100$$

Dc é o diâmetro médio da colônia do fitopatógeno no controle e **Dt** é o diâmetro médio da colônia do isolado endofítico nos tratamentos testados.

4.4.1.2 Teste para detecção da produção de metabólitos voláteis

A metodologia foi realizada em placas de Petri com divisória central, onde se verteu meio BDA em cada um dos lados e posteriormente foram plaqueados discos de Ø8 mm do isolado endofítico de um lado da placa e do outro, discos de Ø8 mm do fitopatógeno *P. citricarpa*. As placas foram vedadas com papel filme PVC e incubadas em BOD durante 14 dias a 28°C. Nas placas controle foram adicionados dois discos de *P.*

citricarpa. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia comparando com o controle.

4.4.1.3 Teste para detecção de metabólitos não voláteis

A técnica baseia-se em cobrir asépticamente toda a superfície do meio BDA, inclusive nas bordas com discos de papel celofane (\varnothing 11 cm). A seguir, foi plaqueados no centro, sobre a superfície do papel celofane, discos de ágar (\varnothing 8 mm) contendo o isolado endofítico. As placas, pós-inoculação foram incubadas por sete dias ou até atingirem aproximadamente 2/3 de toda a placa, a uma temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Mediu-se o diâmetro da colônia e retirou-se o papel celofane (juntamente com a colônia do isolado endofítico). Sobre a superfície de meio BDA, foi plaqueado um disco de micélio do fitopatógeno a ser avaliado no centro da placa. Cada experimento foi realizado com cinco repetições. Nas placas controles inoculou-se apenas o fitopatógeno. As placas foram incubadas a 28°C durante 14 dias. Após este período, mediu-se o crescimento das colônias e comparou-se com o controle (Adaptado SILVA, 2000).

4.4.1.4 Avaliação da ação dos extratos

4.4.1.4.1 Obtenção de extratos com metabólitos secundários

Primeiramente foi realizado levantamento inicial para verificar qual meio de cultura seria melhor estimulante para a produção dos metabólitos secundários. Foram utilizados três isolados actinomicetos em dois tipos de meios de cultura: o meio Czapeck líquido (30,0 g de glicose, 2,0 g de NaNO_3 , 2,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCl, 0,5 g de FeSO_4 e água destilada q.s.p. 1000,0 mL, pH 8,5) e o Caldo Batata Dextrose. Após 14 dias de crescimento, foi avaliada a atividade

antagônica contra o fungo *P. citricarpa*. Padronizou-se o Caldo Batata Dextrose para a extração dos metabólitos dos actinomicetos. Para o processo de fermentação, três discos (Ø 6 mm) do isolado endofítico de interesse foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (250 mL), contendo 100,0 mL de Caldo Batata Dextrose, deixando sob agitação por 14 dias (110rpm, 28°C, fotoperíodo de 12 horas). Após a fermentação, o micélio foi separado do líquido fermentado com filtração em papel Whatman nº 4. Ao volume do filtrado obtido, adicionou-se o mesmo volume de acetato de etila em um balão de separação, agitou-se vigorosamente por três vezes e foi aguardada a formação de duas camadas: Uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Transferiu-se a fase orgânica para um novo recipiente, e foi submetido à fase aquosa a mais uma extração com EtOAc, repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. Foi adicionada a fase orgânica 3% de sulfato de sódio anidro e filtrou-se novamente com papel Whatman nº 4. O filtrado de metabólitos extraídos com EtOAc foi rotaevaporado a 45 °C para não ocorrer degradação de metabólitos termo-sensíveis. Após a secagem o extrato foi pesado e diluído em metanol, para ficar em uma concentração de 10 mg/mL, formando o extrato hidrofóbico. O restante do líquido fermentativo foi liofilizado, pesado e posteriormente diluído em água ultrapura autoclavada, para uma concentração de 10 mg/mL, caracterizando o extrato hidrofílico.

4.4.1.4.2 Inibição do Crescimento micelial

Adicionou-se sobre a placa contendo meio de cultura BDA, 100 µL do extrato metanólico, o qual foi espalhado sobre a mesma com auxílio da alça de Drigalski. Discos (Ø 12 mm) de colônias da cultura do fitopatógeno *P. citricarpa* foram inoculados no centro da placa. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD. Avaliou-se o potencial de inibição medindo o diâmetro das colônias após 14 dias de crescimento, comparando-se com o controle negativo no qual foi inoculada apenas água esterilizada. E como controle

positivo foi utilizado fungicida Derosal ® (1,0 mg/mL), e controle do solvente apenas metanol.

4.4.1.4.3 Formação de picnídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas autoclavadas

Para testar o efeito inibitório dos extratos metanólicos na formação de picnídios, folhas de *Citrus sinensis*, provenientes do Campus do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, foram coletadas, dando preferência para folhas sem lesões. As mesmas foram lavadas em água corrente, cortadas em pequenos fragmentos e autoclavadas por 20 minutos em água destilada. Em cada placa contendo meio Agar-Água foi adicionado um fragmento folicular e nas quatro extremidades do mesmo se adicionou fragmentos de 2 mm do fitopatógeno *P. citricarpa* e sobre o fragmento folicular foi adicionado 10 µl do extrato a ser avaliado. As placas foram vedadas e mantidas a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas, em BOD por 21 dias. Após este período, os picnídios crescidos sobre os fragmentos foliares foram contados por observação sob estereomicroscópio. Como controle positivo utilizou-se o fungicida Derosal ® (1,0 mg/mL), controle negativo água e controle do solvente metanol. Cada extrato foi avaliado em cinco repetições.

4.4.1. 4.4 Avaliação dos extratos na formação da massa celular e produção de picnídios em frutos cítricos destacados

Para avaliar a atividade dos extratos em frutos destacados, foi padronizada a metodologia de indução de sintomas em frutos de *Citrus sinensis* destacados, através de um ferimento com perfuro cortante introduzindo o fitopatógeno *P. citricarpa* no fruto. O ferimento foi vedado com fita crepe e deixado em estufa de crescimento, a 28 °C, exposto a luminosidade em período integral. Para avaliação da ação do extrato sobre o fitopatógeno, sete dias após a inoculação foi adicionado sobre o inóculo no fruto 10 µL do extrato a uma concentração de 100 µg/mL. Avaliou-se sua atividade após 14 dias de crescimento, comparando com o controle onde foi adicionado apenas o fitopatógeno.

4.4.2 Avaliação da atividade antagonista contra patógenos de interesse clínico por Bioautografia

Inicialmente foi realizada a reativação dos microrganismos patogênicos testados: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 35219) e *Staphylococcus aureus* *Meticilina Resistente* (MRSA) (ATCC 33591). As linhagens foram inoculadas em 10 ml de caldo Müller-Hinton / CMH (30,0 g de infusão de carne bovina, 17,5 g de peptona de caseína ácida, 1,5 g de amido e água destilada q.s.p. 1000,0 mL), homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos e incubadas a 35°C por 24h. Após incubação os patógenos foram plaqueados em Müller-Hinton/MH (CMH acrescido com 17,0 g de ágar) e incubados nas mesmas condições anteriores para verificar a pureza das culturas. Com as culturas puras, a partir do tubo com o microrganismo em meio líquido foi preparada uma diluição de 10⁶UFC/mL com base na escala MacFaland nº5 seguida de diluição. Desta, 100µL transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 10 ml de CMH, agitado em agitador de tubos e incubado a 35°C por 48h.

Para testar os extratos obtidos a partir do líquido fermentativo extraído com acetato de etila foram utilizadas placas de sílicagel 60F₂₅₄ (Merck®), conhecidas como placas de CCD, (20x20) cortadas em quadrados de 6x6cm e dividido em 16 quadrados de 1,5cm cada. Um pequeno corte no canto da placa de CCD foi feito para servir de guia. Os extratos solubilizados em metanol na concentração de 10mg/mL foram aplicados no volume de 10 µL em cada fileira na placa, reservando a quarta e última fileira da placa CCD para aplicação do controle positivo: cloranfenicol 500µg/mL para *S. aureus* e 1000µg/mL para *P. aeruginosa*; e nistatina (100000UI/mL) no caso de levedura.

Para realização dos testes uma alíquota de 100 µL do inóculo preparado como descrito anteriormente foi transferido para um tubo contendo 15 mL de MH fundido, mantido em temperatura próxima aos 45°C, para evitar a solidificação momentânea, assim permitiu que o microrganismo seja inoculado sem prejuízo. O tubo foi homogeneizado por

cerca de 30 segundos com agitador de tubos e em seguida o meio foi vertido sobre a placa de CCD (*overlay*), já impregnada com os extratos, presente dentro de uma placa de Petri previamente esterilizada. Após solidificação a placa de Petri foi tampada e incubada a 35 °C por 24 h.

Após o período de incubação, para a melhor visualização dos resultados, as placas de CCD contendo o meio com os inóculos sobrepostos foram totalmente borrifadas com solução aquosa de MTT (2,5 mg/mL), solução amarelada de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-)-2,5-difeniltetrazol que é convertida a coloração arroxeadada ao entrar em contato com enzimas de células viáveis, e incubada por 1-2 horas para posterior leitura. A atividade foi detectada através da formação de halo de inibição (esbranquiçado, indicativo de ausência de células vivas) contra um fundo roxo.

4.5 Análises estatísticas

Para a análise estatística, usaram-se testes estatísticos contidos no pacote BioEstat. Os testes de normalidade seguiram a metodologia de Shapiro-Wilk. Quando as amostras apresentaram normalidade foi aplicado o teste de variável paramétrica, ANOVA um critério. Quando a amostra apresentava distribuição não paramétrica, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento de actinomicetos endofíticos

A partir dos 4.000 fragmentos analisados foram isolados 18 actinomicetos, observando taxa de freqüência de isolamento de 0,45%. Destes 18 isolados, 61,1% (11) foram isolados de pecíolo e 38,9% (07) de folha. Realizando-se análise por local de isolamento observou-se que foram obtidos mais isolados da Nhecolândia (12, ou seja, 66,6%) do que da região do Amolar (06 isolados totalizando 33,4%). Deve-se ressaltar

que no isolamento das amostras do Amolar, se observou um alto índice de crescimento de fungos, mesmo na presença de cicloheximida, podendo este, ser um fator importante e limitante para o menor número de isolados de actinomicetos destes fragmentos.

5.2 Identificação morfológica e molecular dos actinomicetos endofíticos

5.2.1 Caracterização morfológica pela coloração de Gram

Pela macro-morfologia foram selecionados 20 isolados com características de actinomicetos. Para confirmação foi analisada a micro-morfologia, através da técnica de Gram, sendo que dos 20 selecionados em 18 foi observado um crescimento bacteriano filamentososo, com hifas finas e delicadas, características de actinomicetos (FIGURAS 2 e 3).

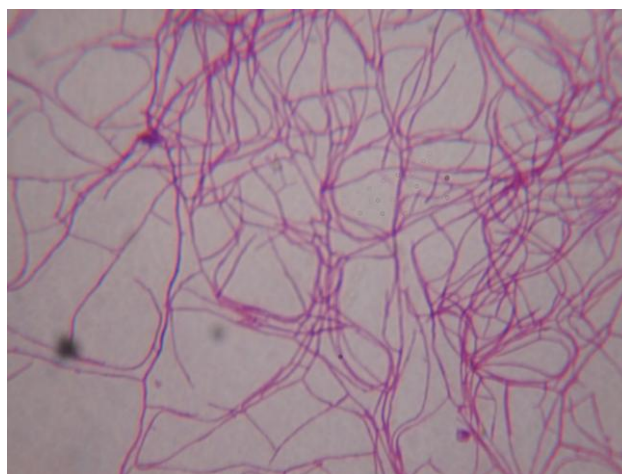


FIGURA 2 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DO ISOLADO N35C1 APRESENTANDO COLORAÇÃO DE GRAM VARIÁVEL

FONTE: O autor (2011)

Nota: aumento de 1.000 vezes

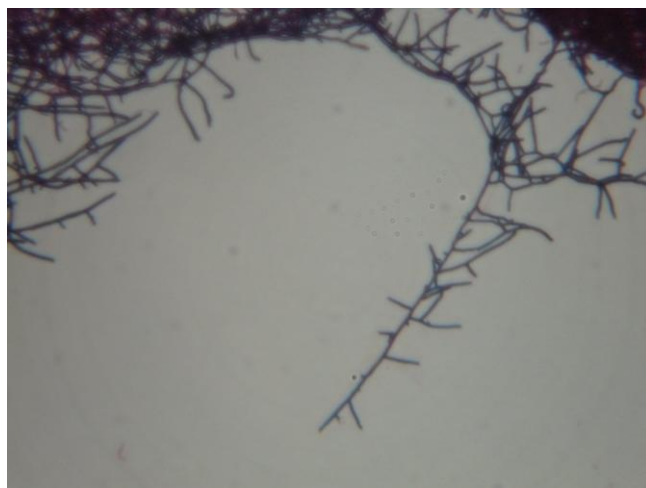


FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DO ISOLADO N3P102 APRESENTANDO COLORAÇÃO DE GRAM POSITIVO.

FONTE: O autor (2011)

Nota: aumento de 1.000 vezes

5.2.2 Identificação molecular por PCR específica para Actinomicetos

Na identificação molecular por PCR família específica, observou-se que 06 isolados amplificaram com os iniciadores Sm6F e Sm5R, que são específicos para família *Streptomycetaceae* que engloba os gêneros *Kitasatospora*, *Streptomyces* e *Streptoverticillium*. Os 12 isolados restantes amplificaram com os Iniciadores 21F e 959R, que são específicos para gêneros da família *Streptosporangiaceae*. Dentro desta família estão os gêneros *Acrocarpospora*, *Herbidospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Planopolyspora*, *Planotetraspora* e *Streptosporangium*. Os iniciadores AMY e ATOP (*Amycolatopsis*) M2R e A3R (*Micromonosporaceae*) e os T3F e T8R (*Thermononosporaceae*) não amplificaram nenhum dos isolados, não pertencendo os endófitos para as famílias em questão.

A FIGURA 4A e B mostram um gel de agarose 1,5% com o produto de PCR. Observa-se a amplificação dos isolados N3P104, A3F5 e A3F10 para os oligonucleotídeos Sm6F e Sm5R. Na FIGURA 4B pode-se observar a amplificação com os oligonucleotídeos 21F e 959R das

amostras N43B2, N3P10, A3F10, N2P10, N4P61, N35C1, A2F4 e N34C1. Na ausência de bandas para os isolados indica que estes não pertenciam à família representada pelos iniciadores em questão.

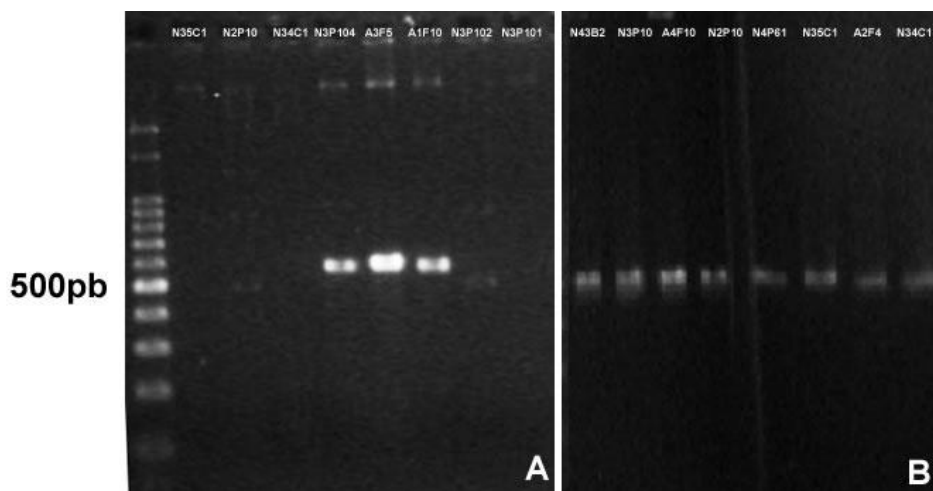


FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR FAMÍLIA ESPECÍFICA. A. PCR COM OS INICIADORES SM6F E SM5R B. PCR COM OS INICIADORES 21F E 959R

Nota: 1: marcador de peso molecular ladder de 100 pb (Invitrogen®); 2 a 17: actinomicetos: N35C1, N2P10, N34C1, N3P104, A3F5, A1F10, N3P102, N3P101, N43B2, N3P10, A4F10, N2P10, N4P61, N35C1, A2F4 E N34C1

FONTE: O autor (2011)

5.2.3 Sequenciamento parcial da região 16S

Para a identificação mais refinada dos isolados foi realizado o sequenciamento parcial da região 16S do rDNA. Nas análises filogenéticas, as seqüências de rDNA 16S dos endofíticos foram alinhadas com seqüências de espécies tipos pertencentes às famílias *Streptosporangiaceae* para as amostras de *Microbispora*, *Streptomycetaceae* para *Streptomyces*, e *Micrococciaceae* para *Micromonospora*.

Por meio destas seqüências, os isolados N43B2, N3P10, N2P10, N4P61, A1F10, N34C1, N5P3, A4F10, A2F4, N35C1 que pertencem à família *Streptosporangiaceae* foram identificados como *Microbispora* sp.

(Figura 5); os isolados N3P101 e N3P102 pertencentes à família *Micromonosporaceae*, foram identificados como *Micromonospora* sp. (FIGURA 6) e os isolados A3F5 e A1F10 pertencentes à família *Streptomycetaceae* foram identificados como *Streptomyces sampsonii* (FIGURA 7).

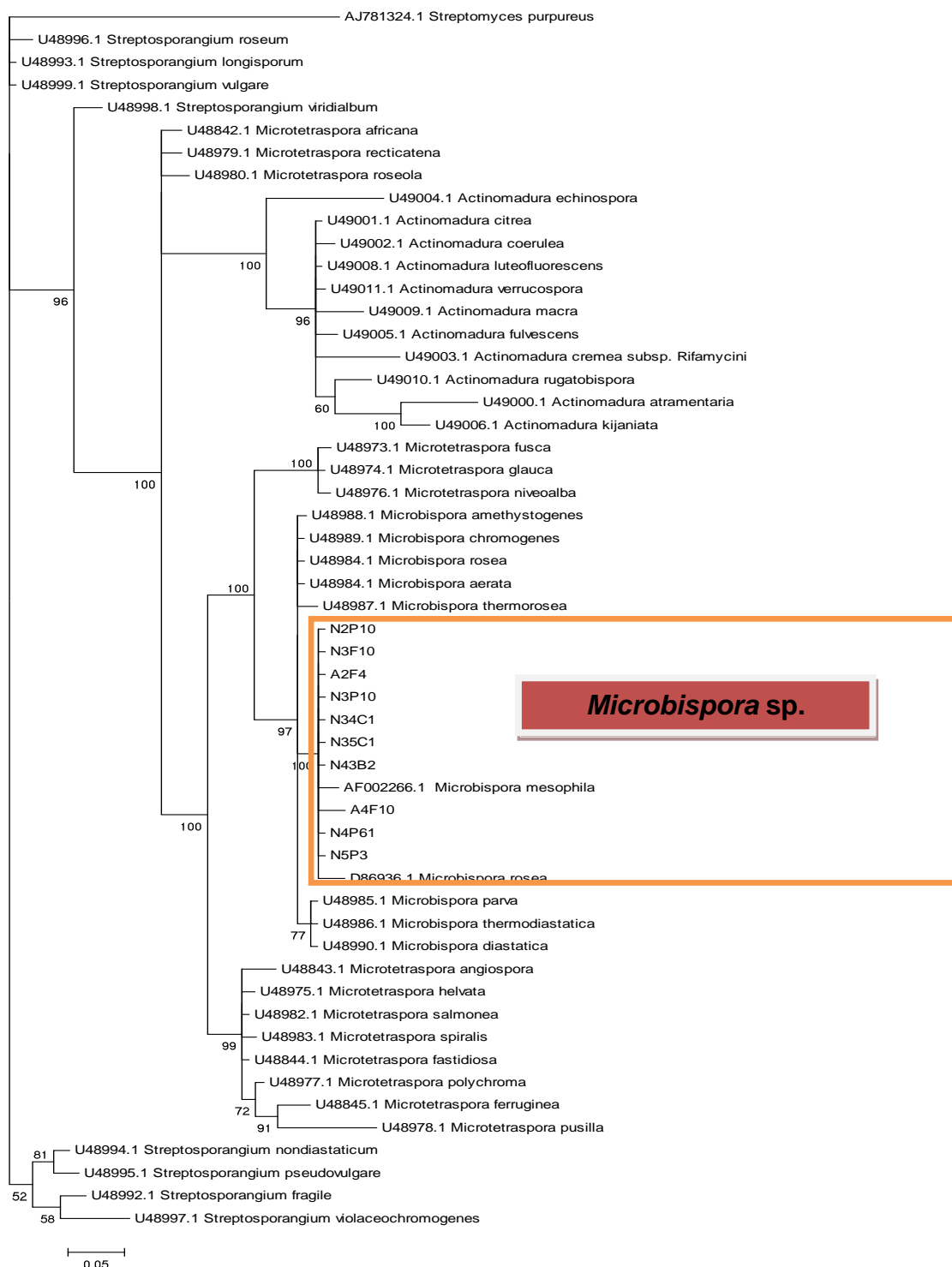


FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S do rDNA (900 pb), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFITICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *Microbispora* E MEMBROS DA FAMÍLIA *Streptosporangiaceae*.

Nota: Método de Bayesianana. Os números a esquerda dos nós representam os valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.

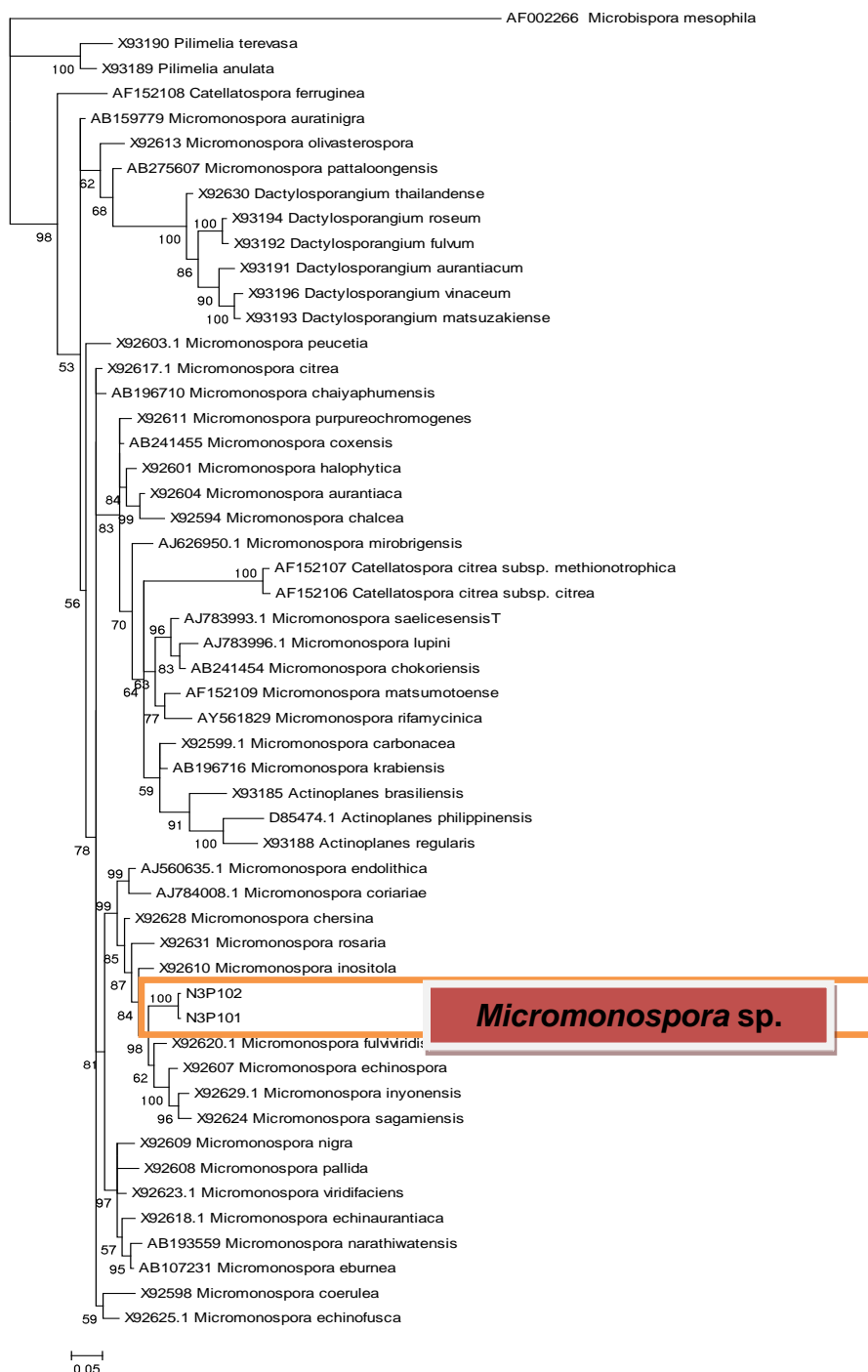


FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S do rDNA (900 pb), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *Micromonospora* E MEMBROS DA FAMÍLIA *Micromonosporaceae*

Nota: Método de Bayesiana. Os números a esquerda dos nós representam os valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.

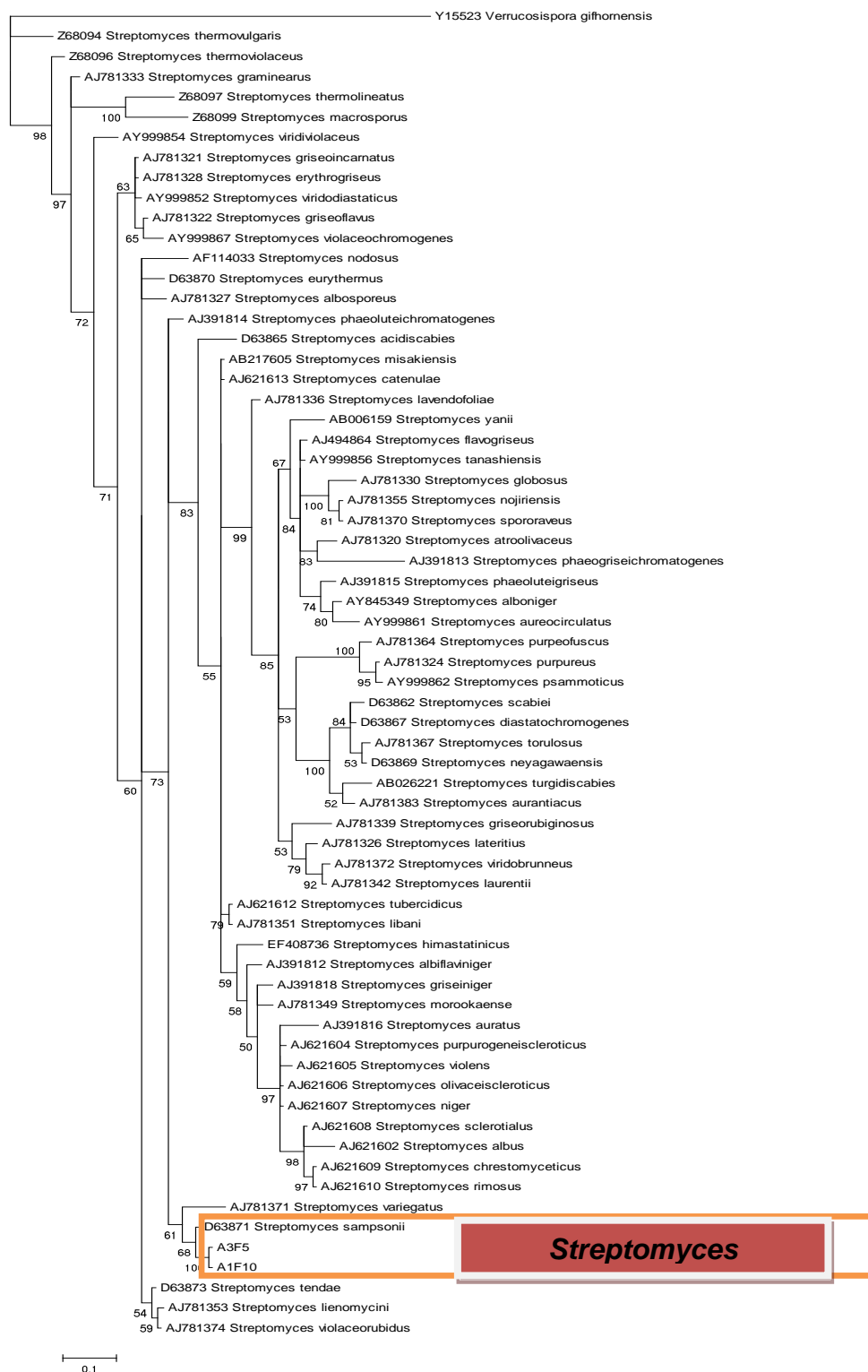


FIGURA 7 – ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE EM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S do rDNA (900 pb), MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E ESPÉCIES RECONHECIDAS DO GÊNERO *Streptomyces* E MEMBROS DA FAMÍLIA *Streptomicetaceae*

Nota: Método de Bayesianana. Os números a esquerda dos nós representam os valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.

5.3 Determinação da atividade antimicrobiana

5.3.1 Antagonismo contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

5.3.1.1 Antagonismo contra *Phyllosticta citricarpa* por da cultura pareada

De acordo com a TABELA 1, os resultados obtidos indicaram que cinco isolados de *Microbispora* sp. (N3P10, N2P10, N5P3, N3P102, N34C1, N4P61, N43B2) e dois de *Streptomyces sampsonii* (A3F5 e A1F10) inibiram mais do que 30% o crescimento micelial do fitopatógeno após 14 dias de crescimento. Destaca-se entre eles, o isolado *Microbispora* sp. N4P61 que inibiu 54% o crescimento micelial do fitopatógeno após 14 dias de crescimento (TABELA 1). Este teste foi utilizado apenas para seleção inicial, pois as diferenças entre os tratamentos não foram significativas nas análises estatísticas (ANEXO 1). Nenhum isolado de *Micromonospora* sp. inibiu o crescimento micelial do fungo *P. citricarpa*.

5.3.1.2 Avaliação da atividade antagônica dos actinomicetos pela produção de metabólitos secundários voláteis

Com os resultados obtidos, não se observou diferença estatística entre o controle e o tratamento, mostrando que os metabólitos que inibiram o crescimento do fitopatógeno no item 5.3.1.1 não são de origem volátil (TABELA 2). O percentual máximo de inibição observado foi de 36%, causado pelo isolado N5P3 (*Microbispora* sp.).

5.3.1.3 Avaliação da atividade antagônica dos actinomicetos pela produção de metabólitos secundários não voláteis

No teste de metabólitos não voláteis, foram utilizados apenas os actinomicetos que apresentaram atividade antagônica no teste de cultura

pareada (N4P61, N2P10, N34C1, N43B2, A1F10, N5P3, A3F5). A maior inibição na leitura no sétimo dia foi causada pelo isolado A3F5 (*Streptomyces sampsonii*) e ao décimo quarto dia o isolado N5P3 (*Microbispora* sp.) inibindo 95% do crescimento do fitopatógeno (TABELA 3).

TABELA 1 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELO MÉTODO DE PAREAMENTO, APÓS 7 E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA

ENDÓFITO	IDENTIFICAÇÃO	INIBIÇÃO AOS 7 DIAS	INIBIÇÃO AOS 14 DIAS
A4F10	<i>Microbispora</i> sp.	1	4
N35C1	<i>Microbispora</i> sp.	4	28
N3F10	<i>Microbispora</i> sp.	4	13
A2F4	<i>Microbispora</i> sp.	7	13
N3P101	<i>Micromonospora</i> sp.	29	25
N3P10	<i>Microbispora</i> sp.	34	28
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	34	34
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	34	35
N3P102	<i>Micromonospora</i> sp.	36	30
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	36	48
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	38	46
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	39	54
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	41	49
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	43	45

FONTE: O autor (2011)

Neste experimento (TABELA 3) pode-se observar que o isolado *Microbispora* sp. N5P3 apresentou o maior percentual de inibição (95%) no 14º dia ($p < 0.05$, ANEXO 2) enquanto na cultura pareada inibiu apenas 35%. Por outro lado, o isolado *Streptomyces sampsonii* A3F5 apresentou a melhor inibição no 7º dia (100%) (TABELA 3). Tal isolado também havia apresentado bons resultados no teste da cultura pareada inibindo 48% (TABELA 1), confirmando assim que a ação do extrato é devido à

produção de metabólitos secundários e não pela disputa por espaço ou nutrientes.

TABELA 2 – MÉDIA DE CRESCIMENTO (cm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS, APÓS 7 E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA

ENDÓFITO	IDENTIFICAÇÃO	INIBIÇÃO AOS 7 DIAS	INIBIÇÃO AOS 14 DIAS
LGMF06	<i>P. citricarpa</i>	1,4	1,7
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	1,3 (7%)	1,6 (6%)
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	1,0 (29%)	1,4 (23%)
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	1,4 (0%)	1,2 (30%)
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	1,5 (0%)	1,8 (0%)
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	1,1 (21%)	1,5 (12%)
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	0,9 (36%)	1,7 (0%)
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	1,0 (29%)	2,0 (0%)

FONTE: O autor (2011)

TABELA 3 – MÉDIA DE CRESCIMENTO (cm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens* PELA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA

ENDÓFITO	IDENTIFICAÇÃO	INIBIÇÃO AOS 7 DIAS	INIBIÇÃO AOS 14 DIAS
LGMF06	<i>P. citricarpa</i>	0,85	1,9
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	0,3 (65%)	0,5 (74%)
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	0,1 (82%)	0,4 (79%)
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	0,1 (82%)	0,45 (76%)
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	0 (100%)	0,6 (68%)
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0 (100%)	0,5 (74%)
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	0 (100%)	*0,1 (95%)
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0 (100%)	0,3 (84%)

Nota: Análise estatística realizada com o Método de Dunn, (*) isolados que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O autor (2011)

5.3.2 Obtenção de extratos com metabólitos secundários

O rendimento de cada extrato está descrito na TABELA 4. Dos extratos hidrofóbicos o que apresentou maior rendimento foi do actinomiceto *Streptomyces sampsonii* A1F10 rendendo 0,098 g, e nos extratos hidrofílicos foi o endofítico *Microbispora* sp. N5P3 com um rendimento de 1,16 g.

TABELA 4 – RENDIMENTO EM GRAMAS DOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*.

ENDOFÍTICO	IDENTIFICAÇÃO	EXTRATO HIDROFÓBICO	EXTRATO HIDROFÍLICO
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	0,0089	0,97
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	0,012	0,70
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	0,019	1,16
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	0,020	0,90
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,073	1,03
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	0,090	1,20
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,098	0,89

FONTE: O autor (2011)

5.3.3 Avaliação da atividade antagônica dos extratos dos actinomicetos endofíticos de *Vochysia divergens*

5.3.3.1 Avaliação dos extratos dos actinomicetos endofíticos na inibição do crescimento da massa celular do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

Os extratos testados foram dos isolados de *Microbispora* sp. N43B2, N2P10, N4P61, N34C1 e N5P3 e de *Streptomyces sampsonii* A1F10 e A3F5. De acordo com os dados apresentados na TABELA 5 observou-se que nos extratos hidrofóbicos, não se observou atividade de inibição significativa na leitura ao sétimo dia, com inibição maior de 62% pelo isolado N34C1 (*Microbispora* sp.). Na leitura ao décimo quarto dia notou-se o aumento da inibição, destacando-se extratos do isolado *Microbispora* sp. N5P3 inibindo 68% ($p < 0.05$, ANEXO 4) e do isolado *Streptomyces sampsonii* A3F5 (55%).

Analisando os extratos hidrofílicos, observou-se uma ação constante, o extrato do isolado N5P3, apresentou uma inibição de 77% ($p < 0.01$, ANEXO 4), o isolado N2P10 inibiu 68%, após 14 dias (FIGURA 8). O isolado N5P3, dentre todos os microrganismos testados, foi o único cujo extrato apresentou inibição significativa ao 7º dia (100%), inibindo totalmente o desenvolvimento micelial de *P. citricarpa*, como se pode observar na TABELA 6.

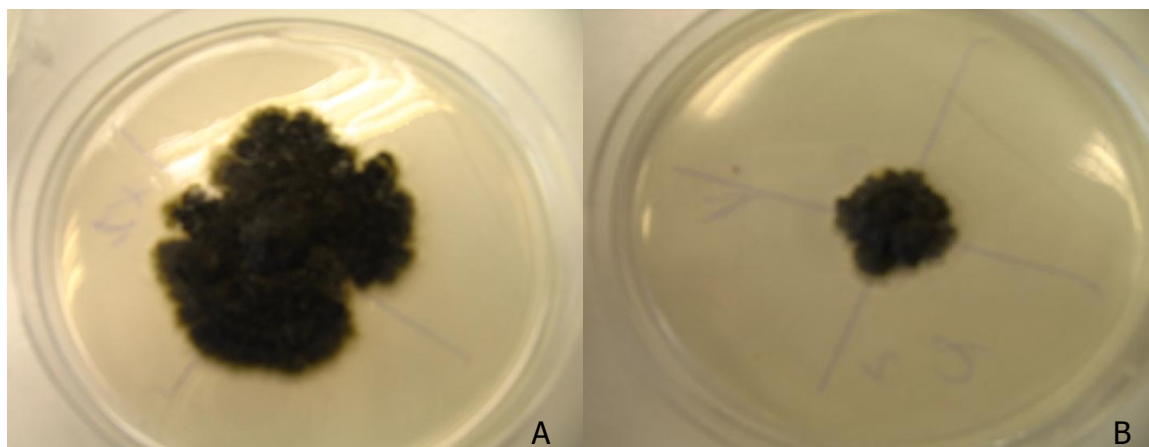


FIGURA 8 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DO ACTINOMICETO N5P3, INIBINDO O CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06) APÓS 14 DIAS DE INCUBAÇÃO. A. Controle negativo, apenas o disco de *Phyllosticta citricarpa*. B. Tratamento com 100 μ L
FONTE: O autor (2011).

TABELA 5 – MÉDIA DE CRESCIMENTO (cm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA

ENDÓFITO	IDENTIFICAÇÃO	INIBIÇÃO AOS	
		7 DIAS	14 DIAS
LGMF06	<i>P. citricarpa</i>	1,05	2,2
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	0,9 (14%)	1,8 (18%)
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	0,6 (43%)	1,2 (45%)
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	0,5 (52%)	1,1 (50%)
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	0,4 (62%)	1,1 (50%)
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,6 (43%)	1,0 (55%)
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,95 (10%)	1,0 (55%)
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	0,5 (52%)	*0,7 (68%)

Nota: Análise estatística realizada com o Método de Dunn, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O autor (2011)

TABELA 6 – MÉDIA DE CRESCIMENTO (cm) PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA CELULAR DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÍLICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, APÓS 7 DIAS E 14 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA

ENDOFÍTICO	IDENTIFICAÇÃO	INIBIÇÃO AOS 7 DIAS	INIBIÇÃO AOS 14 DIAS
LGMF06	<i>P. citricarpa</i>	1,05	2,2
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,8 (24%)	2,0 (9%)
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	0,7 (33%)	1,6 (27%)
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	0,5 (52%)	1,5 (32%)
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	0,4 (62%)	1,2 (46%)
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	0,4 (62%)	1,25 (44%)
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	0,3 (72%)	0,7 (68%)
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	*0 (100%)	*0,5 (77%)

Nota: Análise estatística realizada com o Teste de Tukey, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O autor (2011)

5.3.3.2 Avaliação dos extratos dos actinomicetos endofíticos na inibição da produção de picnídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de *Citrus sinensis* autoclavadas

Observou-se que todos os extratos testados tiveram atividade maior que 30% de inibição da produção dos picnídios de *P. citricarpa*, destacando-se os extratos dos isolados de *Microbispora* sp. N2P10 (66%) e N5P3 (70%) e do isolado de *S. sampsonii* A1F10 (64%) com $p < 0,01$ (ANEXO 5) (FIGURA 9 e TABELA 7). Não foram observadas diferenças significativas da inibição entre extratos hidrofílicos e extratos hidrofóbicos (ANEXO 6).

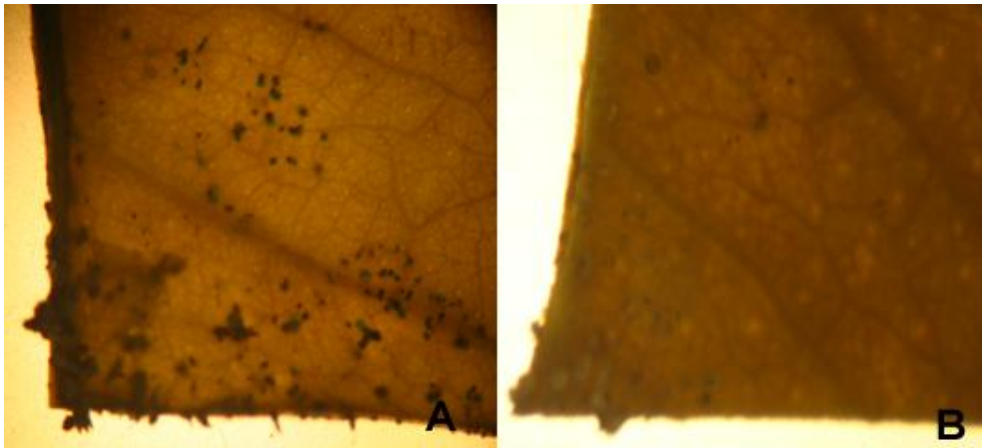


FIGURA 9 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DO ACTINOMICETO *Microbispora* sp. N5P3 NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06) EM FOLHAS DE *Citrus sinensis* AUTOCLAVADAS, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28 °C. A. Controle negativo. B. Tratamento com 10 µL do extrato do endofítico

FONTE: O autor (2011)

Nota: Observação em estereomicroscópio. Aumento de 20 vezes.

TABELA 7 – NÚMERO DE PICNÍDIOS E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* PELOS EXTRATOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, EM MEIO AGAR ÁGUA EM FOLHAS DE *Citrus sinensis* AUTOCLAVAS APÓS 28 DIAS.

ENDÓFITO	IDENTIFICAÇÃO	EXTRATOS HIDROFÓBICOS	EXTRATOS HIDROFÍLICOS
LGMF06	<i>P. citricarpa</i>	448	448
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	* 269 (40%)	*305 (32%)
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	*260 (42%)	*344 (23%)
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	*210 (53%)	*278 (38%)
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	*179 (60%)	*219 (51%)
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	*161 (64%)	*228 (49%)
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	*152 (66%)	*179 (60%)
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	*152 (66%)	*134 (70%)

Nota: Análise estatística realizada com o Teste de Tukey, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O autor (2011)

5.3.3.3 Avaliação dos extratos dos actinomicetos endofíticos na inibição do crescimento da massa celular e formação de picnídios do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* em frutos

Analisando os resultados tanto da inibição de crescimento da massa celular, quanto da inibição da produção de picnídios, o extrato hidrofílico do endofítico *Microbispora* sp. N5P3 foi o que melhor inibiu o fitopatógeno *P. citricarpa* (TABELAS 6 e 7). Em função disso, este extrato foi selecionado para a realização do teste de inibição do crescimento da massa celular e a formação de picnídios diretamente em frutos de *Citrus sinensis* destacados (FIGURA 10). No teste de inibição em fruto, não foi observado crescimento micelial e menos ainda a produção de picnídios no tratamento. Sendo assim, verificou-se que o extrato do isolado

Microbispora sp. N5P3 inibiu totalmente o desenvolvimento de lesões da doença MPC em frutos destacados.

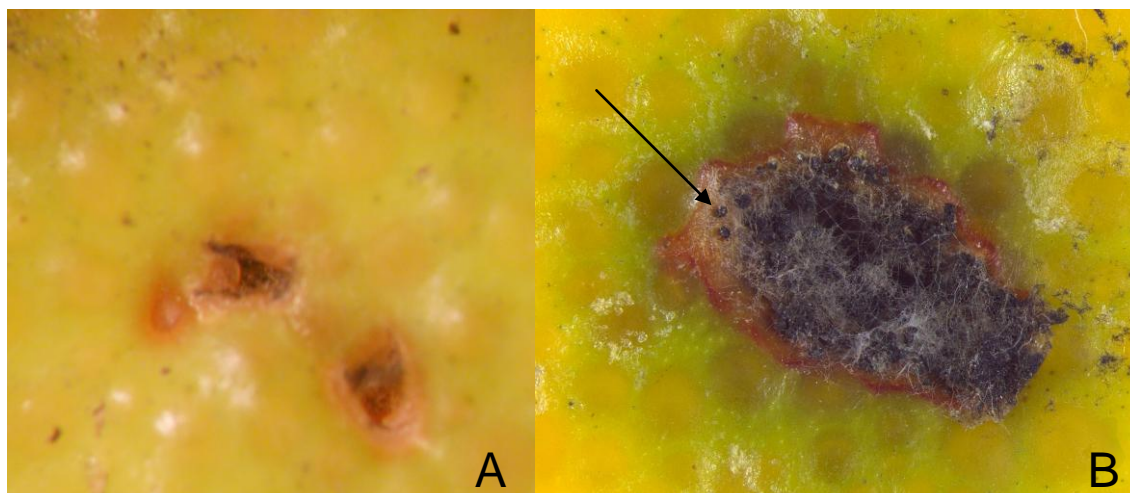


FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIAS DE INDUÇÃO DE LESÕES DE MANCHA PRETA DOS CITROS EM FRUTOS DESTACADOS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO DOS ISOLADO *Microbispora* sp. N5P3 APÓS 14 DIAS DE INCUBAÇÃO. A. Tratamento com 10 μ L do extrato do isolado N5P3 após 14 dias de incubação do inoculo micelial de *Phyllosticta citricarpa* LGMF06. B. Controle positivo, mostrando lesões características de Mancha Preta dos Citros.

FONTE: O autor (2011)

Nota: Observação em estereomicroscópio. Aumento de 20 X. Seta: picnidio de *P. citricarpa*

5.3.4 - Avaliação dos extratos dos actinomicetos endofíticos na inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente, *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida albicans*

Os extratos dos actinomicetos endofíticos de *Microbispora* sp. e *S. sampsonii* que apresentaram atividade contra o fitopatógeno *P. citricarpa* (N43B2, N2P10, N4P61, A3F5, A1F10, N34C1 e N5P3) foram também selecionados para ensaio de inibição de atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 27213), *C. albicans* (ATCC 10231) *E. coli* (ATCC 35219) e MRSA (ATCC 33591). Pode-se observar que os extratos hidrofóbicos de dois

isolados de *Microbispora* sp. (N43B2 e N4P61) e dois de *Streptomyces sampsonii* (A3F5 e A1P10) apresentaram atividade contra a levedura *C. albicans* (TABELA 8). O isolado N4P61 (*Microbispora* sp.) também apresentou atividade contra a bactéria *P. aeruginosa*.

Os extratos hidrofóbicos dos actinomicetos testados não inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *MRSA* (TABELA 8).

TABELA 8 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÓBICO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, SOBRE BACTÉRIAS E LEVEDURA DE INTERESSE CLÍNICO

EXTRATOS	IDENTIFICAÇÃO	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	MRSA	<i>P.</i>	<i>C.</i>
		ATCC 27213	ATCC 35219	ATCC 33591	<i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>albicans</i> ATCC 10231
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	+
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	-
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	+	+
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	-	-	-	-	+
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	-	-	-	-	+
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	-
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	-

FONTE: O autor (2011)

Os extratos hidrofílicos de dois isolados de *Microbispora* sp. (N2P10 e N5P3) e um de *Streptomyces sampsonii* (A3F5) apresentaram atividade contra a levedura *C. albicans*. Um isolado endofítico de *Microbispora* sp. (N34C1) apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus* e *E. coli*). E em destaque observa-se o extrato do actinomiceto N5P3 (*Microbispora* sp.) o qual apresentou antagonismo contra todos os microrganismos testados, ou seja, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e principalmente contra a bactéria *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente como mostra a TABELA 9 e a FIGURA 11.

O isolado A3F5 (*Streptomyces sampsonii*), foi o único a apresentar atividade contra a levedura *Candida albicans* tanto no extrato hidrofílico quanto no hidrofóbico provavelmente pela ação de mais que um composto.

TABELA 9 – AÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO DOS ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vochysia divergens*, SOBRE BACTÉRIAS E LEVEDURA DE INTERESSE CLÍNICO PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA.

EXTRATOS	IDENTIFICAÇÃO	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	MRSA	<i>P.</i>	<i>C.</i>
		ATCC 27213	ATCC 35219	ATCC 33591	<i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>albicans</i> ATCC 10231
N43B2	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	-
N2P10	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	+
N4P61	<i>Microbispora</i> sp.	-	-	-	-	-
A3F5	<i>Streptomyces sampsonii</i>	-	-	-	-	+
A1F10	<i>Streptomyces sampsonii</i>	-	-	-	-	-
N34C1	<i>Microbispora</i> sp.	+	+	-	-	-
N5P3	<i>Microbispora</i> sp.	+	+	+	+	+

FONTE: O autor (2011)

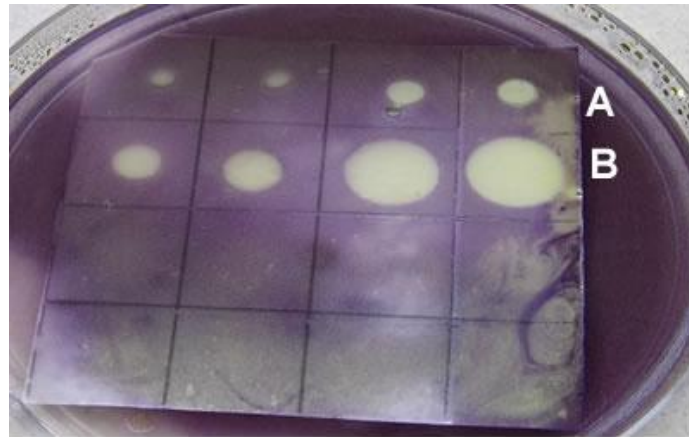


FIGURA 11 – AÇÃO DO EXTRATO DO ACTINOMICETO *Microbispora* sp. N5P3, INIBINDO O CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Candida albicans*, PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA. A. Controle positivo. B. Tratamento com 5 e 10 μ L do extrato hidrofílico do Actinomiceto N5P3, sobre o fungo *Candida albicans*.

FONTE: O autor (2011).

6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento de actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*

O isolamento de actinomicetos endofíticos de folhas da planta *Vochysia divergens* foi realizado com sucesso, apresentando frequência de isolamento de 0,45%, ou seja, de 4000 partes analisadas foram isolados 18 actinomicetos. O isolamento de actinomicetos endofíticos de folhas e partes aéreas de plantas de grande porte começou apenas recentemente. Desta forma, na literatura, solo e raízes são descritos como habitat de actinomicetos com maior frequência.

No presente estudo, foi utilizada a metodologia de fragmentação de folhas e pecíolos em meio AC acrescido de Ciclohexamida para inibição de fungos, e tetraciclina para inibição de bactérias. Betiol (2008) utilizou duas metodologias para o isolamento de actinomicetos em folhas de citros: fragmentação e centrifugação. Foram avaliados 2609 fragmentos de ramos de plantas sadias e doentes, isolando 36 actinomicetos, resultando em uma frequência de isolamento de 1,50%. O autor destaca que as duas metodologias em conjunto aumentam significativamente a taxa de frequência de isolamento. No presente estudo também se observou que o isolamento de actinomicetos de pecíolos foi mais significativo que o de folhas. Dos 18 isolados obtidos, 61,1% (11) foram isolados de pecíolos e 38,9% (07) de folhas. Matssura (1998) isolou 52 linhagens de actinomicetos de folhas, pecíolos e raízes de Cupuaçu sendo que o maior número de isolados foi de raízes, seguido de pecíolos e por último as folhas, corroborando com dados apresentados neste estudo.

Em uma pesquisa realizada no Estado do Amazonas, 482 actinomicetos foram isolados de raízes de plantas de pequeno porte, observar-se uma frequência de isolamento maior, visto que a proximidade do solo facilita a entrada na parte interior da planta (TEIXEIRA, 2007). Correa (2008) observou que fungos filamentosos são mais frequentes em folhas em relação às bactérias e afirma que as folhas são por onde inicialmente os fungos colonizam as plantas. Uma vez que os fungos

crecem mais rapidamente que os actinomicetos, mesmo na presença de cicloheximida como observado no trabalho em questão, pode ser este um fator determinante para o menor número de isolados de actinomicetos de folhas.

Um fator importante para o isolamento de microrganismos endofíticos é a avaliação do protocolo de esterilização de superfície. Feito a deposição de uma alíquota da última lavagem no mesmo meio de cultura do isolamento e não apresentando o crescimento microbiano indica que o protocolo de esterilização de seis etapas foi eficaz em eliminar ou remover os microrganismos epifíticos. Assim, o crescimento posterior de isolados pode ser considerado como endofíticos (QIN *et al.*, 2009).

Outro fator relevante do trabalho é que não se faz presente na literatura estudos sobre a biodiversidade de microrganismos endofíticos da planta *V. divergens*, encontrando apenas um estudo recente sobre as propriedades medicinais da planta, entretanto se desconhece sobre sua comunidade endofítica (CORRÊA, 2007).

6.2 Identificação dos actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*

A coloração de Gram, uma das primeiras etapas na identificação dos actinomicetos permite observar a grande variedade de formas neste grupo de microrganismos. Esta ampla variedade morfológica já havia sido verificada por Connel (2001) que em seu trabalho considerou os actinomicetos um grupo de microrganismos com características morfológicas diversificadas, compreendendo bactérias que se dividem por fissão binária, tais como *Corynebacterium*, espécies com envelope celular e ramificações como *Mycobacterium* e *Nocardia*, até amplamente ramificadas e filamentosas como no caso de *Streptomyces* e *Microbispora*. No presente estudo a coloração de Gram foi utilizada como um teste que selecionou os actinomicetos pelo crescimento micelial Gram positivo ou Gram variável, confirmando a presença de 18 isolados com micélio ramificado.

A utilização da PCR família específica como uma identificação prévia apresentou-se como uma metodologia prática e rápida. Os actinomicetos N2P10, N3F10, A2F4, N3P10, N34C1, N35C1, N43B2, A4F10, N4P61 e N5P3 identificados como pertencentes à família *Streptosporangiaceae*, por esta metodologia, após análise filogenética pode-se concluir que pertencem ao gênero *Microbispora* (FIGURA 5). Apesar dos dados não permitirem a identificação em nível de espécie, sugere-se que todos os 10 isolados de *Microbispora* encontrados pertencem à mesma espécie. A dificuldade na identificação em nível de espécie no presente trabalho residiu especialmente na existência de sequências diferentes depositadas no *GenBank* com mesmo nome, por exemplo, *Microbispora rosea*, bem como a existência de sequências similares depositadas no *GenBank* com diferentes nomes. Tal situação é freqüente nos bancos de dados de sequências e revela a necessidade de revisão e reclassificação de espécies de actinomicetos.

Microbispora mesophila foi isolada de solo e descrita por Nomura e Ohara em 1971, como sendo *Thermomonospora mesophila*. Entretanto, em 1998 Zhang *et al.* trabalhando com sistemática de *Thermomonospora* e *Microtetraspora*, reclassificaram *Thermomonospora mesophila* como sendo a espécie *Microbispora mesophila*. Esses resultados mostram a dificuldade da caracterização deste grupo.

Descrito originalmente por Nonomura e Ohara (1957), o gênero *Microbispora* (espécie tipo *Microbispora rosea*) da ordem *Actinomycetales*, isolada do solo, é caracterizada pela formação de esporos longitudinalmente emparelhados no micélio aéreo. Atualmente a espécie originalmente descrita é denominada de *M. rosea subs rosea*, pois *Microbispora rosea* tornou-se um complexo (NAKAJIMA, 1999). Araújo *et al.* (2000) realizaram isolamento do interior de folhas e raízes de mandioca e conseguiram observar que 60% das cepas analisadas pertenciam ao gênero *Microbispora*.

Os isolados pertencentes à família *Micromonosporaceae* (N3P102 e N3P101) foram identificados como *Micromonospora* sp., entretanto as sequências utilizadas não foram similares com nenhuma das sequências de espécies tipo disponíveis nos bancos de dados (FIGURA 6). Desta

forma, sugere-se o sequenciamento de um número maior de genes para a identificação em nível de espécie, ou inclusive, a descrição de uma espécie nova. Igarashi *et al.* (2011) também isolaram actinomicetos do gênero *Micromonospora*, que apresentaram atividade antibiótica e os autores também relataram dificuldades na identificação deste gênero.

Os isolados A1F10 e A3F5 identificados previamente como pertencentes à família *Streptomicetaceae* por meio de PCR específica, foram identificados pela análise filogenética como *S. sampsonii*. Os dois isolados apresentaram alta similaridade genética (FIGURA 7). A espécie *S. sampsonii* foi descrita por Millard em 1926, sendo isolado de solo, e foi identificado extratos metanólicos dos micélios produzindo um antibiótico do grupo dos polienos com atividade antifúngica (JAIN, 2007). Esta espécie também é encontrada causando doença em batatas no Japão (TAKEUCHI, 1996). Zin *et al.* (2011) identificaram seis endofíticos como pertencentes a espécie *S. sampsonii* das plantas *Cinnamomum zeylanicum*, *Elettariopsis curtisii* e *Zingiber spectabili* do norte da Península da Malásia e que tiveram sua atividade comprovada contra o protozoário *Trypanossoma brucei brucei*. *S. sampsonii* foi relatado como endofítico pela primeira vez no trabalho de Zin *et al.* (2011). O estudo em questão realizou o segundo relato do *S. sampsonii* como endofítico.

Assumpção *et al.* (2009) isolaram e identificaram doze endofíticos de sementes de soja, dentre eles, *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Microbispora*. *Streptomyces* foi o gênero dominante (n = 27, 49,09% dos isolados), seguido por *Streptosporangium* (N = 8, 14,52%) e *Microbispora* sp. (N = 6, 10,90%). No presente estudo, entretanto, *Microbispora* foi o gênero dominante.

Os resultados aqui apresentados revelam a dificuldade na identificação de espécies de actinomicetos, pela falta de sequencias confiáveis disponíveis nos bancos de dados. Além disso, na árvore filogenética da FIGURA 5 observa-se que os valores de *bootstrap* apresentam-se baixos, os quais são comuns em filogenia de actinomicetos (NAKAJIMA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2008). As análises filogenéticas apresentadas revelam que pelo menos 3 espécies de actinomicetos estão

presentes nas plantas de *V. divergens* analisadas. Os isolados de *Streptomyces* foram presentes apenas em plantas de *V. divergens* da região do Amolar. Por outro lado, o gênero *Micromonospora* foi isolado apenas da região da Nhecolândia e *Microbispora* de ambos.

O presente trabalho foi o primeiro a descrever a comunidade microbiana de actinomicetos endofíticos da planta medicinal *V. divergens*, presente no Pantanal Sul Matogrossense e também o primeiro relato de *S. sampsonii* endofítico com atividade antifúngica contra *P. citricarpa* (TABELA 5 e 6) e *C. albicans* (TABELA 8).

6.3 Antagonismo dos actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens* frente ao fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

O teste de cultura pareada foi utilizado neste estudo como um levantamento inicial para seleção dos actinomicetos que apresentariam atividade antagônica, independente do modo de ação: produção de metabólitos voláteis, metabólitos não voláteis, competição por nutrientes, e competição pelo espaço (ROMEIRO *et al.*, 2007).

Analisou-se a atividade antagônica de 18 actinomicetos frente ao fitopatógeno *P. citricarpa*, sendo selecionados sete endofíticos (39%). Os isolados que apresentaram atividade foram: N2P10, N5P3, N34C1, N4P61, N43B2 pertencentes ao gênero *Microbispora* e os isolados A3F5 e A1F10 caracterizados como *Streptomyces sampsonii*, os quais foram utilizados para testes de metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. Em função dos prejuízos causados por *P. citricarpa* aos frutos cítricos são imprescindíveis a realização de estudos que dêem ênfase ou suporte ao controle biológico da doença.

Araujo (2010) testou a atividade antagônica de 15 fungos, contra o fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* com a técnica de cultura pareada, sendo que os fungos *Epicoccum* sp. e *Sporobolomyces* sp. mostraram antagonismo *in vitro* para *M. oryzae*. Sendo essa uma boa técnica para selecionar quais microrganismos podem apresentar um potencial antagônico, entretanto isoladamente não possui muito valor, pois

no caso de fungos que tem um crescimento rápido o resultado positivo pode ser apenas por uma disputa de espaço em placa.

No presente estudo não se observou a produção de metabólitos voláteis contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, visto que não houve diferença entre o controle no qual se fazia presente apenas *P. citricarpa* do tratamento. Figueiredo (2006) observou que três isolados de *Xilaria* spp. apresentaram inibição contra o fitopatógeno *P. citricarpa* pela produção de metabólitos voláteis, mas quando se realizou o teste de Tukey, os mesmos não apresentaram diferença significativa. Bomfim (2007) observou atividade antagônica pela produção de metabólitos voláteis contra o fitopatógeno *Rhizopopus stolonifes* pelos fungos *Trichoderma viride* e *T. harzianum*. No caso do fungo *P. citricarpa* seria um resultado interessante para tratamento em *containers*, pois os frutos saem sadios do porto e chegam ao destino devido às condições de pressão, temperatura e umidade com sintomas, podendo ser utilizado esse tipo de metabólito como uma alternativa para tratamento pós-colheita.

Visto que a inibição não ocorre pela produção de metabólitos voláteis, realizou-se o teste para detecção de metabólitos não voláteis, no qual observou-se que os isolados testados inibiram o crescimento do fitopatógeno *P. citricarpa* pela produção de metabólitos fixos. Na leitura ao sétimo dia quatro microrganismos inibiram 100% o crescimento do fitopatógeno (N43B2, A1F10, N5P3, A3F5). A menor inibição na leitura ao décimo quarto dia foi de 68% pelo isolado N43B2 (*Microbispora* sp.) e a máxima de 95% pelo endofítico N5P3 (*Microbispora* sp.) destacando-se também o isolado A3F5 (*Streptomyces sampsonii*) que inibiu 84%. Dentre os resultados obtidos destaca-se o isolado N5P3 que apresentou uma ação constante durante 14 dias. Figueiredo (2006) utilizou a técnica de metabólitos não voláteis e observou a produção destes por dois endofíticos contra o fitopatógeno *P. citricarpa*. Bomfim (2007) também avaliou a produção de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* sp. sobre o fitopatógeno *Rhizopopus stolonifes* onde também todos os microrganismos testados produziram substâncias que inibiram o crescimento do fitopatógeno.

6.4 Obtenção e avaliação de extratos de actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*

6.4.1 Obtenção dos metabólitos secundários de actinomicetos endofíticos da planta *Vochysia divergens*

Os sete microrganismos que apresentaram atividade na produção de metabólitos não voláteis (N4P61, N2P10, N34C1, N43B2, A1F10, N5P3 e A3F5) foram selecionados para a extração de metabólitos secundários. Quando se avalia a produção de metabólitos antifúngicos e antibacterianos, sabe-se que a produção é influenciada por componentes do meio de cultura e condições de crescimento (IWAI e OMURA, 1982).

O tempo de incubação é fator importante na produção de metabólitos secundários. Em geral, a biossíntese de metabólitos secundários é ativada na fase final do crescimento logarítmico ou já na fase estacionária da fermentação, quando a divisão celular e a produção de biomassa ocorrem em níveis muito baixos (TAKAHASHI, 2008). Este tempo em actinomicetos corresponde próximo ao décimo quarto dia. No estudo em questão testou-se o crescimento por 7 e 14 dias, e revelou que quando os nutrientes estão em menor quantidade, ou seja, no décimo quarto dia, a quantidade de metabólitos secundários foi aumentada.

Segundo Bouejella *et al.* (2005) que isolaram actinomicetos de amostras de solo, os actinomicetos apresentaram uma boa atividade bioativa em 14 dias de incubação, resultados que corroboram com os dados do presente estudo.

Segundo Silva (2000) para a produção de metabólitos a menor prioridade é o crescimento rápido, assim quando o crescimento é restrito pela depleção de nutrientes ou a baixa disponibilidade de algum nutriente essencial esta é aumentada. Nas condições utilizadas para a produção de antibióticos por fungos, parece consenso que meios de cultura de constituição complexa são mais adequados. Entretanto meios relativamente simples, como o Caldo Batata Dextrose, têm apresentado resultados encorajadores (TAKAHASHI, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, onde metabólitos extraídos de caldos de fermentação em Caldo Batata Dextrose que é um meio

relativamente simples apresentaram uma boa atividade contra bactérias e fungos. Já quando foi realizado o teste inicial com o caldo Czapeck, os metabólitos extraídos não apresentaram uma boa atividade antagônica.

Almeida (2010) isolou 19 actinomicetos da planta *D. stelechantha*, para testar atividade antagônica contra *B. cereus*. O protocolo utilizado pelo autor para a fermentação e extração de metabólitos secundários foi o mesmo que o presente trabalho. Dos 19 actinomicetos isolados seis apresentaram atividade antifúngica, evidenciando que o Caldo Batata Dextrose, apesar de ser um meio relativamente simples e extremamente barato, estimula a produção de metabólitos secundários por fungos e actinomicetos como se observou no presente estudo.

6.4.2 Avaliação de extratos de actinomicetos endofítico da planta *Vochysia divergens* frente ao fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*

Os metabólitos secundários foram testados contra o fitopatógeno *P. citricarpa* para analisar se inibiriam o crescimento da massa celular, a produção de picnídios e o surgimento de sintoma em frutos.

Na avaliação de inibição da formação da massa celular do fitopatógeno, foram testados sete extratos hidrofílicos e sete hidrofóbicos. Os extratos hidrofóbicos apresentaram uma melhor atividade ao 14^o dia destacando-se os isolados N5P3 (68%), A3F5 (55%), mas não apresentaram atividade significativa no 7^o dia. Nos extratos hidrofílicos, observou-se que os metabólitos do isolado N5P3 apresentaram inibição total (100%) do crescimento micelial após 7 dias de incubação e após 14 dias inibiu 77%, mostrando uma atividade constante. Figueiredo (2006) utilizando a mesma metodologia com fungos endofíticos da planta medicinal *Maytenus ilicifolia*, contra *P. citricarpa* encontrou dois fungos do gênero *Pestalotiopsis* que controlaram o crescimento deste fitopatógeno.

Utilizando extratos de actinomicetos para ensaio de antibiose, Cao *et al.*, (2005) obteve 24 linhagens (18,3%) que foram antagônicas a *F. oxysporum* o agente do Mal do Panamá, uma doença que atinge bananas.

Dados que mostram que explorar metabólitos de microrganismos pode ser uma fonte promissora para controle de pragas.

A inibição da produção de picnídios de *Phyllosticta citricarpa* é de grande relevância, pois os picnídios são a forma de disseminação deste fitopatógeno no campo. Os extratos testados inibiram em até 70% a produção de picnídios em folhas autoclavadas (TABELA 7), destacando-se os extratos hidrofílicos e hidrofóbicos do isolado N5P3 (*Microbispora* sp.) que inibiu respectivamente 70 e 66% e o isolado N2P10 (*Microbispora* sp.) cujos extratos hidrofílico e hidrofóbico inibiram respectivamente 60% e 66%. Figueiredo (2006) também identificou dois fungos endofíticos que apresentaram inibição significativa no número de picnídios de *P. citricarpa* (15%). Uma vez que a produção de picnídios nas lesões de MPC nos frutos cítricos é a característica principal para declarar a existência de frutos com sintomas na amostra analisada, este se torna um meio de restringir o aparecimento dos sintomas característicos das lesões. Como a presença de pelo menos uma lesão de MPC em frutos da amostragem causa a recusa na importação pela Comunidade Econômica Européia, estratégias que minimizem o aparecimento de picnídios de *P. citricarpa* em frutos cítricos, são de fundamental importância e representam um avanço nas pesquisas de controle desenvolvidas.

Coimbra (2010) isolou 22 actinomicetos a partir da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas, e destes, 10 isolados reduziram significativamente o número de galhas de *M. javanica* no tomateiro e 4 inibiram a formação de ovos do patógeno. Neste patossistema, os ovos são responsáveis pela disseminação da doença, semelhante aos picnídios de *P. citricarpa* na MPC. Isso demonstra a importância de atividade de actinomicetos no controle biológico, podendo ser utilizado como tratamento alternativo de fitopatologias.

Analisando os resultados da inibição do crescimento da massa celular e produção de picnídios, o extrato com melhor atividade antagônica ao fungo *P. citricarpa* foi o extrato do endofítico *Microbispora* sp N5P3, o qual foi utilizado para análise em frutos cítricos. No teste de inibição em fruto, o tratamento inibiu o crescimento micelial do fungo e em decorrência não houve a produção de picnídios, inibindo o surgimento da lesão da

MPC em frutos destacados. Esta medida poderia ser utilizada no tratamento pós-colheita de frutos cítricos que serão submetidos ao transporte. Até a presente data não há registros na literatura de metodologia de ensaios de inibição de lesões de MPC utilizando-se frutos cítricos destacados. Os resultados aqui apresentados são importantes pelo desenvolvimento desta metodologia e pela inibição no desenvolvimento de lesões de MPC apresentada por *Microbispora* sp. N5P3.

Correa (2008) trabalhou com microrganismos isolados de citros, para controle biológico da *P. citricarpa*, selecionando 20 fungos para testes em campo. Destes apenas dois apresentaram atividade nos testes em frutos. Entretanto, os resultados apresentados por Correa (2008) diferem do presente estudo, pois o autor utilizou apenas frutos ainda em campo, utilizando pomar de região endêmica. No estudo em questão, utilizaram-se frutos destacados induzindo e tratando a lesão local, diminuindo ao máximo o número de variáveis, garantindo a existência do inóculo de *P. citricarpa* e mostrando que a inibição do crescimento fúngico e desenvolvimento das lesões foram causadas pelo tratamento.

A bioprospecção de microrganismos ou seus metabólitos que atuem no controle de fungos fitopatogênicos faz-se necessária, gerando o uso menor de fungicidas e possivelmente um controle mais eficiente da doença. Na MPC as medidas de controle da doença atualmente baseiam-se no emprego de tratamentos culturais e principalmente no controle químico. No entanto, o uso de fungicidas protetores e sistêmicos acarreta no aumento significativo do custo na produção, causa contaminações para o meio ambiente e aumenta a pressão de seleção sobre a população de fitopatógenos.

Em citros, os fungos *Lecanicillium* sp. e *Hirsutella* sp. já vem sendo utilizados no controle dos ácaros da leprose e da ferrugem, respectivamente, com grande sucesso (ALVES, 2004). Esta estratégia é bastante interessante, visto que foi identificada a resistência destes contra os acaricidas utilizados no campo, ficando ainda pendente microrganismos para o controle biológico de outras patologias de citros, entre elas a MPC, que ainda causa prejuízos econômicos.

Sendo o Brasil detentor de um terço da produção mundial de citros e 85% da produção do suco da fruta, a citricultura representa uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (AGRIANUAL, 2009). Faz-se crescente o interesse na busca por microrganismos endofíticos e na descoberta de compostos bioativos que poderão ser utilizados como ferramentas no controle de fitopatógenos, em especial ao controle do fitopatógeno *P. citricarpa*.

Muitos estudos referem-se ao papel de actinomicetos endofíticos na proteção das plantas contra fitopatógenos e influência de seus produtos metabólicos no crescimento das plantas e fisiologia. Metabólitos microbianos podem ter um papel ativo no desenvolvimento de resistência contra as doenças por mediar a interação entre os endofíticos e seu hospedeiro (LEE *et al.*, 2008).

6.4.3 Avaliação dos extratos dos actinomicetos endofíticos na inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente, *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida albicans*

Analisando a ação dos extratos hidrofóbicos observa-se que 57% (4) dos extratos avaliados, apresentaram inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, sendo produzidos a partir dos isolados N43B2, N4P61 pertencentes ao gênero *Microbispora* e A3F5 e A1F10 caracterizados como *Streptomyces sampsonii*. Na avaliação dos extratos hidrofílicos 43% (N2P10, N5P3 ambos do gênero *Microbispora* e A3F5 *Streptomyces sampsonii*) inibiram o crescimento da levedura avaliada. Destaca-se o isolado A3F5 em que ambas as frações (hidrofílica e hidrofóbica) apresentaram atividade contra a levedura *C. albicans*, provavelmente pela ação de mais de um composto ativo. Ouhdouch *et al.* (2001) avaliaram a capacidade de produção de metabólitos antifúngicos de 320 actinomicetos isolados de vários habitats dos quais 22 apresentaram atividade contra *C. albicans*. No estudo em questão, um percentual maior inibiu a respectiva levedura, fato que provavelmente

deve-se a seleção prévia contra o fitopatógeno *P. citricarpa* que é um eucarioto como a levedura.

No teste de inibição da bactéria *P. aeruginosa*, apenas dois extratos de *Microbispora* sp. mostraram-se efetivos, o extrato hidrofóbico do microrganismo N4P61, e o extrato hidrofílico do endofítico N5P3. Tais resultados evidenciam que a forma de extração dos metabólitos secundários é de extrema importância, e que determinados compostos só estarão presentes em determinadas frações. Durante a avaliação dos actinomicetos contra bactérias patogênicas Gram-negativas poucos isolados foram capazes de inibir este grupo. A baixa atividade contra bactérias Gram-negativas pode estar associada à estrutura complexa de membrana externa destes microrganismos, tornando-se importante a descobertas de novos compostos para seu tratamento (ANDRIOLI, 2009).

Na análise contra *E. coli* os extratos hidrofílicos de dois isolados de *Microbispora* sp. (N34C1 e N5P3) apresentaram atividade, não apresentando inibição os metabólitos extraídos com Acetato de Etila. Resultados encontrados por Borg *et al.* (2009) que isolaram actinomicetos endofíticos de plantas medicinais na China divergem dos aqui apresentados, mostrando 65,9% de atividade contra *E. coli*, 24,4 % contra *S. aureus* e apenas 12,2% contra *C. albicans*. *E. coli* é a principal responsável por infecções do trato urinário e apresenta frequentemente resistência aos antibióticos usados no tratamento, como as cefalosporinas de terceira geração (BORG *et al.*, 2009).

A atividade antagônica contra *S. aureus* foi observada na fração hidrofílica em dois extratos, provenientes dos isolados de *Microbispora* sp. N34C1 e N5P3. Murakami *et al.* (2008) isolaram *Streptomyces* sp. que apresentou bioatividade contra *S. aureus* com Concentração Inibitória Mínima de 100 µg/mL. O extrato hidrofílico do actinomiceto endofítico N5P3 apresentou atividade contra a bactéria *S. aureus* Meticilina resistente (MRSA), a qual é um sério problema em infecções hospitalares. Este isolado deve ser mais bem explorado e caracterizado em etapas futuras. Vários resultados indicam que actinomicetos endofíticos associados com plantas medicinais são uma fonte promissora para a pesquisa de novas drogas. No trabalho realizado

por Malik *et al.* (2008), a proteína secretada por *Streptomyces fulvissimus* apresentou uma atividade significativa contra cepas de *MRSA*.

Novos agentes antimicrobianos são extremamente necessários para combater o número crescente de cepas resistentes, sendo que produtos naturais continuam sendo a fonte mais propícia de antibióticos. É amplamente aceito que actinomicetos são produtores de compostos bioativos naturais. E é argumentado que a probabilidade da descoberta de um novo composto tendo uma estrutura química nova pode ser aumentada com o isolamento de espécies raras, e para isso sugere-se a triagem em ambientes inexplorados.

Actinomicetos raros são geralmente considerados como as cepas de actinomicetos cuja frequência de isolamento é muito menor do que as cepas isoladas de *Streptomyces* por métodos convencionais e, portanto, pode ser considerado como um recurso fecundo para o isolamento de microrganismos menos explorados (TIWARI *et al.*, 2011).

O fato de algumas linhagens não apresentarem atividade antimicrobiana detectável, não significa que estas sejam incapazes de produzir antibióticos. Novos ensaios utilizando outros meios de cultivo para o crescimento dos actinomicetos e outros microrganismos-teste poderão ser utilizados posteriormente, visando melhorar a detecção de antibiose. Especialmente porque desde 2002, mais de 22 mil compostos bioativos têm sido descobertos a partir de microrganismos. Isto incluiu 20 mil antibióticos, principalmente produzidos por actinomicetos (45%), fungos (38%) e bactérias unicelulares (17%). Dos antibióticos a partir de actinomicetos, cerca de 80% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*, sendo um microrganismo que produz geralmente mais do que um composto ativo (ANDRIOLI, 2008). *Streptomyces* é um gênero em que a exploração por compostos bioativos já vem sendo amplamente realizada, ficando as outras espécies negligenciadas, sendo estas possíveis produtoras de compostos antimicrobianos ainda não descritos. O presente trabalho mostrou que o isolado N5P3 (*Microbispora* sp.) produziu compostos ativos contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, e os patógenos humanos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e ao *S. aureus*

resistente a metilina, provavelmente através da produção de mais de um metabólito ativo.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- Isolados de *Microbispora* sp., *Micromonospora* sp. e *Streptomyces sampsonii* habitam como endófitos as plantas de *Vochysia divergens* avaliadas;
- Sete isolados pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Microbispora* são promissores no controle biológico do fitopatógeno *P. citricarpa* e para o tratamento pós-colheita de frutos cítricos;
- Padronizou-se a metodologia de avaliação de extratos de endófitos na inibição de sintomas de MPC em frutos cítricos destacados;
- O isolado N5P3 (*Microbispora* sp.) inibe o desenvolvimento de lesões de MPC em frutos cítricos, devendo ser melhor explorado para o controle biológico da doença;
- O extrato hidrofílico do isolado N5P3 (*Microbispora* sp.) apresenta atividade contra todos os microrganismos testados, inclusive *S. aureus* Meticilina Resistente.

8 PERSPECTIVAS

- Aprimorar as condições de fermentação dos endófitos identificados como produtores de atividade antimicrobiana, como meio de cultura, pH, aeração e tempo de cultivo, para a obtenção de maior rendimento dos extratos ativos, permitindo a realização de ensaios químicos;
- Isolar os compostos ativos dos extratos para a caracterização química das moléculas;
- Estudar outras atividades para os extratos (bioprospecção) de acordo com a classe de compostos presente;
- Para os endófitos que também apresentaram bons resultados no ensaio contra *P. citricarpa* avaliar atividade em fruto destacados, uma vez que a metodologia foi padronizada;
- Desenvolver metodologias para testar a atividade dos extratos em frutos não destacados, e inibição da produção de picnídios em folhas caídas, testar a inibição em pomar e também simular as condições de transporte, analisando o melhor momento para o tratamento;
- Testar a atividade antimicrobiana contra outros patógenos de interesse clínico como *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, que são causa de infecções hospitalares e conhecidas pela capacidade de adquirirem multirresistência;
- Realizar testes de toxicidade dos extratos ou dos compostos ativos;
- Realizar seqüenciamento multigênico dos actinomicetos avaliados para identificação em nível de espécie e para verificar se os isolados N3P101 e N3P102 classificados como *Micromonospora* sp., são mesmo uma espécie nova como sugeriu a análise parcial do gene 16S do rDNA.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS - **Associação Brasileira dos Exportadores de Citrus. Série histórica de exportação de suco de laranja.** Disponível em: <WWW.abecitrus.com.br>. Acesso em: 20/04/2011.

AGRIANUAL. **Mercados & Perspectivas.** Anuário da Agricultura. São Paulo: FNP, pág. 286, 2000.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. **Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros.** Brasília. MAPA/SDA/DDIV. 2002.

ALMEIDA, F.G.O. **Antibiose de extratos de fungos e actinomicetos endofíticos isolados na amazônia brasileira de *duguetia stelechantha* contra *Bacillus cereus*.** Revista da SBPC. v. 2, 2010.

ALVES, E.B. **A resistência dos ácaros a acaricidas em citros.** Visão agrícola. v.2, pág. 82-86, 2004.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. **Ação antagônica de riobactérias contra *Phytophthora parasitic* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros.** Revista Brasileira de Fruticultura. v.24, pág. 565-568, 2002.

ANDRIOLI, W.J. **Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Federal de São Paulo, 2009.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da da ESALQ, 1996.

ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, C.I.; AGUILAR-VILDOSO, P.A. **Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks.** Can. J. Microbiol. v. 47, pág. 229–236, 2001.

ARAUJO, W.L.; MARCON, W.; MACCHERONI, J.D.; VAN ELSAS, J.W.L.; AZEVEDO, J.L.. **Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants.** Appl. Environ. Microbiol. v. 68, pág. 4906–4914, 2002.

ARAÚJO, L.G. **Antibiose de fungos do filoplano de plantas de arroz a *Magnaporthe oryzae*.** Rev. Biol. Neotrop. v.7, pág. 1-6, 2010.

ARNOLD, A.E. **Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology**. *Mycologia*. v. 99, pág. 185–206, 2008.

ASSUMPÇÃO, L.C. *et al.* **Diversity and biotechnological potential of endophytic bacterial community of soybean seeds**. *Pesquisa agropecuária brasileira*. v.44, pág. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants**. *Electronic Journal of Microbiology*. v. 3, pág. 40-65, 2000.

BARY, A. **Morphologie Physiologieder pilze**. *Physiological Botany*. v.2, 1866.

BERSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. **Internal fungi in old-growth fir foliage**. *Canadian Journal of Botany*. v.55, pág. 644-653, 1977.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguaraúna: Embrapa CNPDA. pág 388, 1991.

BETIOL, W. **Desenvolvimento de substrato supressivo à murcha do crisântemo causada por *Fusarium Oxysporum***. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da UNESP, 2008.

BI, S.F.; LI, F.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. **New acrylamide and oxazolidin derivatives from a termite-associated *Streptomyces* sp.** *Nat Prod Commun*. v. 6, pág. 353-355, 2011.

BOMFIM, M.P. **Antagonismo in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo**. Tese apresentada a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2007.

BORG, M.A. *et al.* **Antibiotic consumption as a driver for resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* within a developing region**. *American journal of infection controll*. v.8, pág. 37-42, 2009.

BOTEON, M. **Cadeia Agroindustrial de Citros**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP). Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br> . Acesso 21/04/2011.

BOUDJELLA, H. *et al.* **Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* sp. isolated from a Saharan soil**. *Microbiological research*. pág. 1-11, 2005.

CARDOSO FILHO, I.A. **Efeito de extratos de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guinardia citricarpa*)**. Tese apresentada ao programa de

Pós-Graduação em Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

CLAY, K. **Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi**. *Ecology*. v. 69, pág. 10-16, 1988.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J. **Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots**. *FEMS Microbiology Letters*. v.247, pág. 147–152, 2005.

CASTILHO, U. *et al.* **Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia***. *FEMS Microbiology Letters*. v. 224, pág. 183-190, 2003.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. **Efeito antagônico de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro**. *Revista de biologia e ciências da terra*. v.10, pág. 1519-5228, 2010.

CONNELL, N.D. **Expression systems for use in actinomycetes and related organisms**. *Curr Opin in Biotechnol*. v.12, pág. 446-449, 2001.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice, of biological control of plant pathogens**. The American Phytopathological Society. pág. 539, 1983.

COOMBS, J.T.; FRANCO, C.M. **Isolation and identification of actinobacteria isolated from surface-sterilized wheat roots**. *Appl. Environ. Microbiol*. v. 69, pág. 5303–5308, 2003.

CORDEIRO, F.; DIETRICH, S.M.C. **Phytoalexin Induction by Leaf-Surface Fungi of Tropical Rubiaceae**. *Ciência e Cultura*. v. 44, pág. 342-344, 1992.

CORRÊA, M.F.P. **Aspectos químicos e potencial terapêutico de *Vochysia divergens* (*Vochysiaceae*), uma planta do Pantanal Matogrossense**. Dissertação Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

CORRÊA, A.S. **Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa***. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CUNHA, C.N.; De OLIVEIRA, E.V.R. **Influência da seca na dinâmica de população de indivíduos juvenis de *Vochysia divergens* Pohl. fazenda retiro novo - Pantanal - III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**. 2006.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. **Mycotoxins**. Animal Feed Science and Technology. v. 69, pág. 155-166, 1997.

EICKHOFF, T.C. *et al.* **Antibiotics and nosocomial infections**. Hospital infections. v.1, pág. 201-14, 1998.

ELANDER, R.P. **Industrial production of b-lactam antibiotics**. Applied Microbiology and Biotechnology. v.61, pág. 385-392, 2003.

EL-GENDY, M.M.A.; HAWAS, U.W.; JASPARS, M. **Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp.** ALAA 2000. Antibiotics. v.61, pág. 379–386, 2008.

FAO, A. **International standards for phytosanitary measures: guidelines for regulating wood packing material in the international trade**. Secretariat of the International Plant Protection Convention. pág. 14, 2002.

FAWCETT, H.S. **Citrus disease and control**. New York: McGraw Hill Book, pág. 656, 1936.

FEICHTENBERGER, E. **Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo**. Laranja. v.17, pág. 93-108, 1996.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; AMEUR-MEHDI, R.B.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. **Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80**. Research in Microbiology. v.156, pág. 341–347, 2005.

FIEDLER, H.P. *et al.* **Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosispora***. J Antibiot. v.61, pág. 158–163, 2005.

FIGUEIREDO, J.A.G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. **A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark *Alnus* species in England and Switzerland**. Mycological Research. v.94, pág. 313-319, 1990.

FLECK, A. *et al.* **Aplicação da versão em português do instrumento de avaliação de qualidade de vida da Organização Mundial da Saúde (WHOQOL-100)**. Rev. Saúde Pública. v.33. pág. 198-205, 1999.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. pág. 7, 2003.

GARBEVA, P.; OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, W.; VAN ELSAS, J.D. **Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA-based PCR fragments.** *Microb. Ecol.* v.41, pág. 369–383, 2001.

GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLOTOWICZ, R.M. **Identity and behavior of xylem-resident bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees.** *Applied and Environmental Microbiology.* v.43, p.1335-1342, 1982.

GERMIDA, J.J.S.D.; SICILIANO, R.; FREITAS, A.M. **Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.).** *FEMS Microbiol. Ecol.* v.26, pág. 48–50, 1998.

GOES, A. *et al.* **Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guinardia citricarpa*.** *Summa Phytopathologica.* v.28, pág. 9-13, 2005.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINNOR, A. **Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression.** *Phytopathology.* v.92, pág. 976-985, 2002.

GUIMARÃES, V. C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata*.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium Series.* v. 41, pág. 95-98, 1999.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. **Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic Nematodes and Soil-Borne plant pathogenic fungi.** *European Journal of Plant Pathology.* v.102, pág. 155-162, 1996.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. **Bacterial endophytes in agriculture crops.** *Canadian Journal of Microbiology.* v.43, pág. 895-914, 1997.

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. **Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinobacteria in a P-deficient soil under greenhouse conditions.** *Appl. Soil Ecol.* v. 40, pág. 510-517, 2008.

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. **Endophytic actinobacteria and their interactions with host plants.** Actinomycetologia. v.20, pág. 72-81. 2006.

HUELSENBECK, J.P.F.; RONQUIST, R.; NIELSEN, J.; BOLLBACK, P. **Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology.** Science. v. 294, pág. 2310-2314, 2004.

IGARASHI, Y.; OGURA, H.; FURIHATA, K. **Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp.** Biotechnology Research Center. v. 180, pág. 939-942, 2011.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. **Selection of microbial sources of bioactive compounds. The search biactive compounds from microganisms.** New Yourk: spring-verlag. pág. 281-302, 1982.

JACOBY, T.S. **Associação entre consumo de antimicrobianos e multirresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de Hospital Universitário Brasileiro, 2004-2006.** Monografia apresentada ao curso de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

KIELY, T.B. **Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus.** Proceedings of Linnean Society of New South Wales. v.73, pág. 249-292, 1948.

KLOEPPER, J.W.; BEURECHAN, C.J. **A review of issues, related to measuring colonization of plants roots by bacteria.** Canadian Journal of Microbiology. v.38, pág. 1219-1232, 1992.

KOTZÉ, J.M. **History and epidemiology of citrus black Spot in South Africa.** Proceedings of the International Society of Citriculture. v.2, pág.1296-1299,1996.

LEE S.O.; CHOI G.J.; CHOI Y.H.; JANG K.S.; PARK D.J.; KIM C.J.; KIM J.C. **Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*.** J Microbiol Biotechnol. v.18, pág. 1741–1746, 2008.

LEVINE, D.P. **Vancomycin: a history.** Clin. Infect. Dis. v.42, pág. 5-12, 2006.

LIU, C.H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R.X.. **Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi.** Journal of Biotechnology. v. 88, pág. 277-282, 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil.** Nova Odessa: Franciscana. pág. 608, 1998.

- LOWY, F.D. *et al.* **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus***. Journal Clinical Investigation. v.111, pág. 1265-1273, 2003.
- MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, 1998.
- MALIK, *et al.* **Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus***. Indian Journal of Experimental Biology. v.46, pág. 254-257, 2008.
- MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM, WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELOW, M. **Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments**. Antonie van Leeuwenhoek. v. 87. pág.11–18, 2005.
- MARIANO, R. L. R. **Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas. v.1, pág. 369-409, 1993.
- MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. **Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB**. Science agriculture.v. 55, pág. 1, 1998
- MARUNA, M.; STURDIKOVA, M.; LIPTAJ, T.; GODANY, A.; MUCKOVA, M.; CERTIK, M.; PRONAYOVA, N.; PROKSA, B. **Isolation, structure elucidation and biological activity of angucycline antibiotics from an epiphytic yew streptomycete**. Journal of Basic Microbiology. v.50, pág.1-8, 2010.
- MATSUURA, T. **Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*)**. Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pernambuco, 1998.
- MCINROY, J.; KLOEPPER, J. **Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton**. Can. J. Microbiol. v. 41, pág. 895–901, 1995.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente. v. 1, pág. 262, 1998.
- MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. **Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization**. Crop Prot. v.25, pág. 468-475, 2006.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PÉREZ, L. M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. **Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato.** Electronic Journal of Biotechnology. v. 6, 2003

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M., LIMA, M. L. R. Z. C.; POSSAMAI, J. C. **Controle em pós colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos.** Fitopatologia Brasileira. v. 27, pág. 395-398, 2002.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. **Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium endophyte*.** Molecular General Genetics. v.233, pág. 1-9, 1992.

NARAYANA, K.J.P.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M.; VENKATESWARLU, Y.; KRISHNA, P.S.J. **Study on Bioactive Compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277.** Polish Journal of Microbiology. v.57, pág. 35-39, 2008.

NAKAJIMA, Y.; KITPREECHAVANICH, V.; SUZUKI, K.; KUDO T. ***Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil.** Int. J. Syst. Bacteriol. v. 49, pág. 1761-7, 1999.

NEJAD P.; JOHNSON P.A. **Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato.** Biol. Control. v.18, pág. 208–215, 2000.

NISHIMURA, T. *et al.* **An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and Its antifungal activity.** J. Gen. Plant Pathol. v.68, pág. 390-397, 2002.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. **Distribution of actinomycetes in soil. XI. Some new species of the genus *Actinomadura*.** Ferment Technol. v. 49, pág. 904–912, 1971.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. **Actinomycetes of moroccan habitats : isolation and screening for antifungal activities.** European journal soil biology. v.4, pág. 69-74, 2001.

PEREIRA, J.O. **Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da ESALQ, 1993.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. **Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento**

de ***Staphylococcus aureus*** e ***Escherichia coli***. *Ciência e Agrotecnologia*. v.32, pág. 887-893, 2008.

PETRINI, O. **Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues**. *Microbiology of the Phyllosphere*. pág. 175-87, 1986.

PETRINI, O. **Fungal endophyte of tree leaves**. *In: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds)*. *Microbial Ecology of Leaves*. pág.179-197, 1991.

PLATELL, J.L.; JOHNSON, J.R.; COBBOLD, R.N.; TROTT, D.J. **Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods**. *Vet. Microbiol*. v. 13, 2011.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá, Embrapa - CPAP. 1994.

PROVOROV, N. A.; BORISOV, I. A.; TIKHONOVICH. A. **Comparative genetics and evolutionary morphology of symbiosis formed by plants with nitrogen-fixing microbes and endomycorrhizal fungi**. *Zh Obshch Biol*. v. 63, pág. 451-72, 2002.

QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M. **Screening antifungal activitis of selected medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*. v.74, pág. 89-96, 2001.

READING, C.; COLE, M. **Clavulanic acid – beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.11, pág. 852-857, 1977.

RITZAU, M.; HEINZE, S.; FLECK, W.F.; DAHSE, H.M.; GRÄFE, U. **New Macrodiolide Antibiotics, 11-O-Monomethyl- and 11,11 ϵ -O-Dimethylelaiophylins, from *Streptomyces* sp. HKI-0113 and HKI-0114**. *J. Nat. Prod*. v.61, pág.1337-1339, 1998.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. **Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola***. *Pesq. Agropec. Brás*. v. 31, pág. 905-909, 1996.

RODRIGUES, R.J.; SAMUELS, G.J. **Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm**. *Mycological Research*. v.94, pág. 827-830, 1990.

RODRIGUES, I.M.C., SOUZA FILHO, A.P.S., FERREIRA, F.A. **Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias**. *Planta Daninha*. v. 27, pág. 507-513, 2009.

ROMEIRO, R. S. *et al.* **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Viçosa, 2007.

ROSSETO, P.M.; AZEVEDO, F.A.; MATELII, I.B. **Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranja doce**. Revista Fitossanidade. 2010.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. **Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches'Broom Disease**. International Journal Biology Science. v. 1, pág. 24-33, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. **Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities**. Can. J. Microbiol. v.50, pág. 239–249, 2004.

SICILIANO, S.D.C.M.; THEORET, J.R.; FREITAS, P.J.; HUCI, J.J. GERMIDA, D. **Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat**. Can. J. Microbiol. v.44, pág. 844–851, 1998.

SILVA, A.C.; ARAUJO, J.M.; AZEVEDO, J.L. **Ocorrência de actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*)**. 20^o Reunião anual de Genética de Microrganismos, Piracicaba. v. 20, 1995.

SILVA, M.P.; MAURO, R.; MOURÃO, G.E.; COUTINHO, M. **Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo**. Revista Brasileira de Botânica. v.2, pág. 143-152, 2000.

SOARES, D.G.S. *et al.* **Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas de fitoterápicos**. Revista Odonto Ciência. v.21, pág. 232-238, 2006.

SOUZA, L.P.; ASTOLFI FILHO, S.; PEREIRA, J.O. **Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais**. Resumos da 7^a Reunião Especial da SBPC, 2004.

STAMFORD, T.L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)**. Ciênc. Tecnol. Aliment. v.8, pág. 382-385, 1998.

STIERLE, A.; STROBELI, G.; STIERLE, D. **Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew**. Science. v.260, pág. 214-216, 1993.

STROBEL, G.A.; MILLER, R.V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; HESS, W.M. **Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis quercina***. Microbiology. v.17, pág. 417-423, 1999.

STROBEL, G.A. *et al.* **Endophytes as sources of bioactive products.** *Microbes Infect.* v.5, pág. 535–544, 2003.

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

STURD, M.L.; COLE, L.J. **Studies on endogenous bacteria in potato tubers infected by *Phitophthora erythroseptica* Pethybr.** *Annual Botanic.* v.8, p. 122-127, 1974.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.G.; MATHESON, W.J.; ARSENAULT, BUCHANAN, A. **Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens.** *Plant Pathol.* v. 48, pág. 360–369, 1999.

SUKUMARAN, J.; MARK T. **SumTrees: Summarization of Split Support on Phylogenetic Trees.** Version 1.0.2. Part of the DendroPy Phylogenetic Computation Library Version 3.7.0 (<http://packages.python.org/DendroPy/>), 2010.

SUKUMARAN, J.; MARK T. **DendroPy: A Python library for phylogenetic computing.** *Bioinformatics.* v. 26, pág. 1569-1571, 2010.

SURETTE M.A.; STURZ A.V.; LADA R.R.; NOWAK J. **Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L.): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth.** *Plant Soil.* v. 253, pág. 381–390, 2003.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. **Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* v.19, pág. 381–385, 2003.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. **Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity.** *J. Antibiot.* v.45, pág. 766, 2008.

TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. **Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences.** *Int. J. of Syst. Bacteriol.* v. 46, pág. 476-479, 1996.

TAN, H.M.; CAO, L.X.; HE, Z.F.; SU, G.J.; LIN, B.; ZHOU, S.N. **Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro.** *World J. Microbiol Biotechnol.* v.22, pág. 1275–1280, 2006.

TEIXEIRA, M.A.; SOARES, I.M. **Pesquisa de microrganismos endofíticos.** *Pesq. agropec. bras.* v.42, pág. 43-49, 2007.

TENOVER, F.C. *et al.* **Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview.** *Clinical Infections Diseases*. v.33, pág. 108-115, 2001.

TIAN, X.L.; CAO, L.X.; TAN, H.M.; HAN, W.Q.; CHEN, M.; LIU, Y.H.; ZHOU, S.N.; **Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice.** *Microb. Ecol.* v.53, pág. 700–707, 2007.

TIWARI, K.; GUPTA, R.K. **Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics.** 2011.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*. v. 22, pág. 4673–4680, 1994.

UEKOTTER, A.; PETERS, G.; BECKER, K. **Is there any rationale for treatment of *Staphylococcus aureus* infections with antimicrobials that are determined to be ineffective in vitro?** *Clin. Microbiol. Infect.* v. 10, pág. 1469-1481, 2011.

YUAN, H.M.; ZHANG, X.P.; ZHAO, K.; ZHONG, K.; GU, Y.F.; LINDSTROM, K. **Genetic characterisation of endophytic actinobacteria isolated from the medicinal plants in Sichuan.** *Ann. Microbiol.* v.58, pág. 597– 604, 2008.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. **Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*.** *FEMS-Microbiology Letters*. v.193, pág. 249-253, 2000.

WANG, H.; LIU, N.; XI, L.; RONG, X.; RUAN, J. HUANG, Y. **Genetic screening strategy for rapid access to polyether ionophore producers and products in actinomycetes.** *Appl. Environ. Microbiol.* v. 10, pág. 3433-3442, 2011.

WATTAL, C.; JOSHI, S.; SHARMA, A.; OBEROI, J.K.; PRASAD, K.J. **Prescription auditing and antimicrobial resistance at a tertiary care hospital in New Delhi, India.** *J. Hosp. Infect.* v.59, pág. 156-158, 2005.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; MAITHILI, M.; JOG, B.; BHOLE, D. **How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?** *Arch Microbiol.* v.176, pág. 386–390, 2001.

WEINSTEIN, M.J.; LUEDEMANN, E.M.; ODEN, G.H.; WAGMAN, J.P. **Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*.** *J. Med. Chem.* v.6, pág. 463-464, 1963.

WULANDARI, N.F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K.D.; DUONG, L.M.; GRUYTER, J.; MEFFERT, J.P.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W.

***Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maxima in Asia.** Fungal Diversity. v. 34, pág. 23-39, 2009.

VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARASUBIYE, T.; GARON, M.; DE'RY, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. **Glucanolytic actinobacteria antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. rubi, the causal agent of raspberry root rot.** Appl. Environ. Microbiol. v.62, pág. 1630-1635, 1996.

VELAZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M.J.; RIVAS, R.; ZURDO-PINEIRO, J.L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E.J. **Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants.** J Basic Microbiol. v.48, pág. 118–124, 2008.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N.; GANGE, A.C. **Endophytic actinobacteria from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity.** Microbiol. Ecol. v.57, pág. 749-756, 2009.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; RUAN, J. **Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*.** Journal Int. J. Syst. Bacteriol. v. 48, pág. 411-412, 1998.

ZHAO, P.J.; FAN, L.M.; LI, G.H.; ZHU, N.; SHEN, Y.M.; **Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131.** Arch. Pharm. Res. v.28, pág. 1228–1232, 2010.

ZIN, N.M. *et al.* **Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula.** Federation of European Microbiological Societies. v.274, pág. 83-88, 2007.

ZIN. M.N. *et al.* **Anti-trypasomal activity of endophytic streptomycete,** Curr. Research in Bacteriol. v. 4, pág. 1-8, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA DEMONSTRANDO O TESTE DE CULTURA PAREADA DOS ACTINOMICETOS FRENTE O FITOPATÓGENO *P. citricarpa*

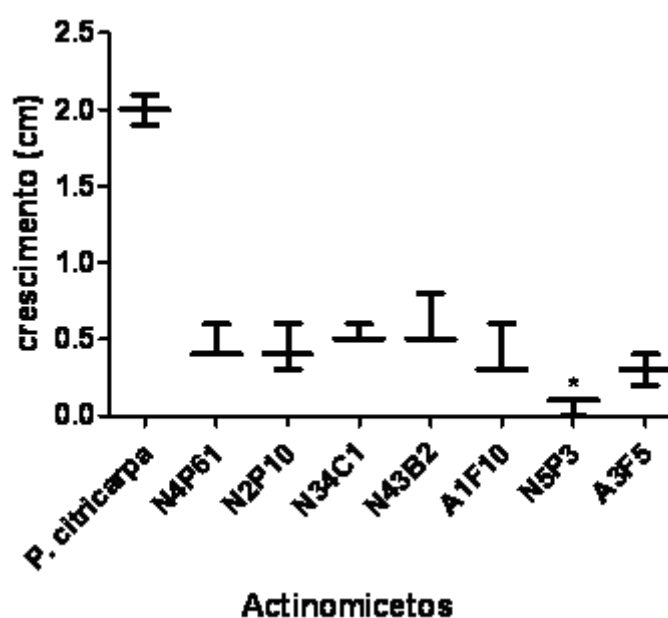
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	Z crítico	P
A4F10	12.3333	2.4344	3.038	Ns
N35C1	7.5000	1.4804	3.038	Ns
N3F10	10.8333	2.3227	3.038	Ns
A2F4	12.8333	2.5331	3.038	Ns
N3P101	7.6667	1.5133	3.038	Ns
N3P10	5.8333	1.1514	3.038	Ns
N2P10	4.8333	0.9540	3.038	Ns
N5P3	4.5000	0.8882	3.038	Ns
N3P102	0.5000	0.0987	3.038	Ns
A3F5	4.6667	0.9211	3.038	Ns
N34C1	6.5000	1.2830	3.038	Ns
N4P61	9.3333	1.8423	3.038	Ns
N43B2	5.3333	1.0527	3.038	Ns
A1F10	0.1667	0.0329	3.038	Ns

ANEXO 2 – TABELA DEMONSTRANDO A AÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NÃO VOLÁTEIS FRENTE A *P. citricarpa* LEITURA AO SÉTIMO DIA

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	Z calculado	z crítico	P
N4P61	3	0,5196	3,125	ns
N2P10	9,8333	1,7032	3,125	ns
N34C1	9,1667	1,5877	3,125	ns
N43B2	15,5	2,6847	3,125	ns
A1F10	15,5	2,6847	3,125	ns
N5P3	15,5	2,6847	3,125	ns
A3F5	15,5	2,6847	3,125	ns

ANEXO 3 – TABELA E GRÁFICO DEMONSTRANDO A AÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NÃO VOLÁTEIS FRENTE A *P. citricarpa* LEITURA AO DÉCIMO QUARTO DIA

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	Z calculado	z crítico	p
N4P61	9,8333	1,7032	3,125	Ns
N2P10	11,1667	1,9341	3,125	ns
N34C1	7,1667	1,2413	3,125	Ns
N43B2	6,3333	1,097	3,125	ns
A1F10	12,5	2,1651	3,125	ns
N5P3	21	3,6373	3,125	< 0.01
A3F5	16	2,7713	3,125	ns



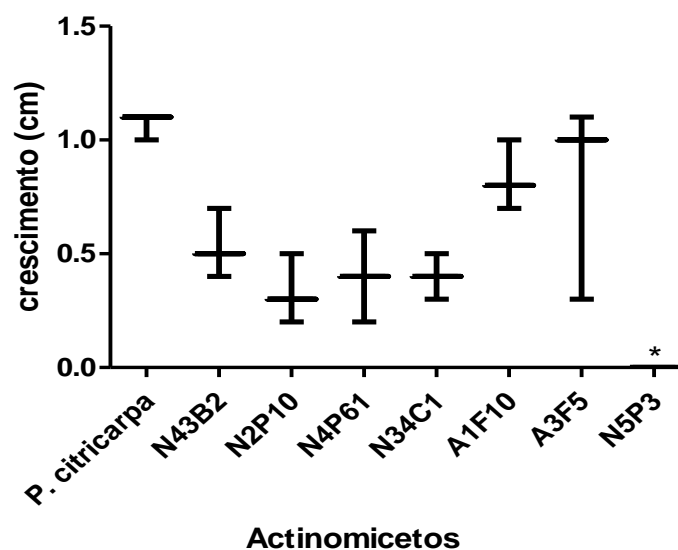
Nota: Análise estatística realizada com o Método de Dunn, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O Autor

ANEXO 4 - EXTRATOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *P. citricarpa* NO SÉTIMO DIA

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	Z calculado	z crítico	P
N43B2 HIDROFÓBICO	3	0,5196	3,125	Ns
N2P10 HIDROFÓBICO	10,1667	1,7609	3,125	Ns
N4P61 HIDROFÓBICO	14,5	2,5115	3,125	Ns
N34C1 HIDROFÓBICO	16,6667	2,8868	3,125	Ns
A1F10 HIDROFÓBICO	10,1667	1,7609	3,125	Ns
A3F5 HIDROFÓBICO	0,8333	0,1443	3,125	Ns
N5P3 HIDROFÓBICO	14	2,4249	3,125	Ns
N43B2 HIDROFÍLICO	8,8333	1,53	3,125	Ns
N2P10 HIDROFÍLICO	13,8333	2,396	3,125	Ns
N4P61 HIDROFÍLICO	12,1667	2,1073	3,125	Ns
N34C1 HIDROFÍLICO	12	2,0785	3,125	Ns
A1F10 HIDROFÍLICO	3,8333	0,664	3,125	Ns
A3F5 HIDROFÍLICO	5,3333	0,9238	3,125	Ns
N5P3 HIDROFÍLICO	20	3,4641	3,125	< 0.01

Massa Celular - Extrato Hidrofílico - 7 Dias



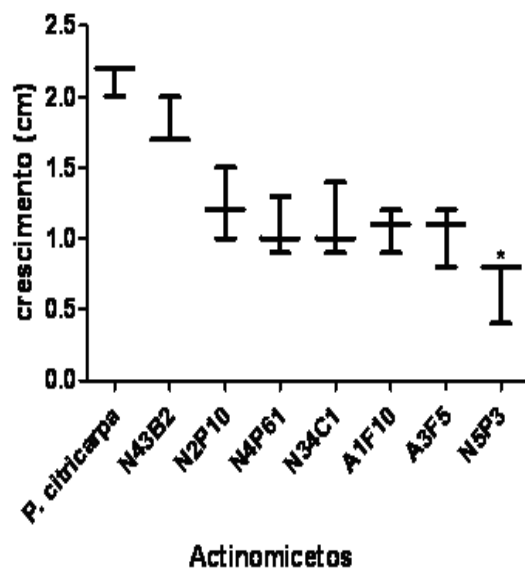
Nota: Análise estatística realizada com o Método de Dunn, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O Autor

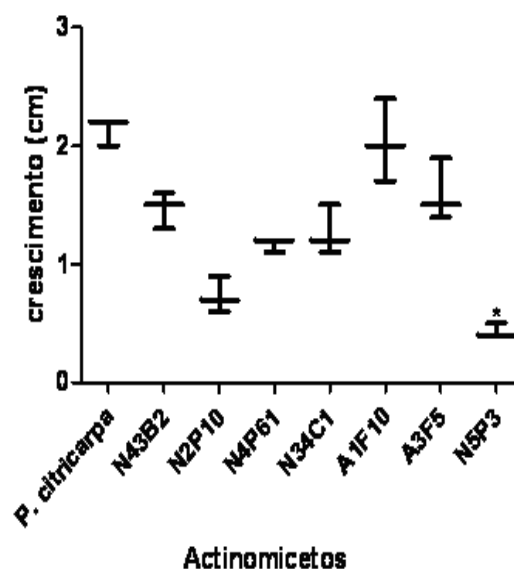
ANEXO 5 – TABELA E GRÁFICOS DEMONSTRANDO A AÇÃO DOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *P. citricarpa* NO DÉCIMO QUARTO DIA

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	P
N43B2 HIDROFÓBICO	2,6667	0,4619	3,125	Ns
N2P10 HIDROFÓBICO	9,1667	1,5877	3,125	Ns
N4P61 HIDROFÓBICO	12,5	2,1651	3,125	Ns
N34C1 HIDROFÓBICO	12,1667	2,1073	3,125	Ns
A1F10 HIDROFÓBICO	12,3333	2,1362	3,125	Ns
A3F5 HIDROFÓBICO	13,3333	2,3094	3,125	ns
N5P3 HIDROFÓBICO	20,5	3,5507	3,125	< 0.05
N43B2 HIDROFÍLICO	7,1667	1,2413	3,125	ns
N2P10 HIDROFÍLICO	16,8333	2,9156	3,125	ns
N4P61 HIDROFÍLICO	12,6667	2,1939	3,125	ns
N34C1 HIDROFÍLICO	11	1,9053	3,125	ns
A1F10 HIDROFÍLICO	1	0,1732	3,125	ns
A3F5 HIDROFÍLICO	6,1667	1,0681	3,125	ns
N5P3 HIDROFÍLICO	19,8333	3,4352	3,125	< 0.05

Massa Celular - Extrato Hidrofóbico - 14 Dias



Massa Celular - Extrato Hidrofílico - 14 Dias



Nota: Análise estatística realizada com o Método de Dunn, (*) extratos que apresentaram atividade de inibição com um $p < 0,01$ em comparação ao controle.

FONTE: O Autor

ANEXO 6 – TABELA DEMONSTRANDO A AÇÃO DOS EXTRATOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DO FITOPATÓGENO *P. citricarpa*

Tukey:	Diferença	Q	(p)
N5P3 Hidrofílico	96,8	15,9862	< 0.01
N2P10 Hidrofílico	96,8	15,9862	< 0.01
A1F10 Hidrofóbico	44,8	7,3986	< 0.01
N34B2 Hidrofílico	78,4	12,9475	< 0.01
A3F5 Hidrofóbico	75	12,386	< 0.01
A3F5 Hidrofílico	93,8	15,4908	< 0.01
METANOL	0,4	0,0661	Ns
N2P10 Hidrofóbico	88,6	14,632	< 0.01
N5P3 Hidrofóbico	102,2	16,878	< 0.01
A1F10 Hidrofílico	54,8	9,05	< 0.01
N4P61 Hidrofílico	55	9,0831	< 0.01
N43B2 Hidrofóbico	74,6	12,3199	< 0.01
A1F10 Hidrofílico	88,4	14,599	< 0.01