

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANA TONIAL

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ENDÓFITOS E DE EXTRATOS FOLIARES DE
Schinus terebenthifolius Raddi (AROEIRA)

CURITIBA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FABIANA TONIAL

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ENDÓFITOS E DE EXTRATOS FOLIARES DE
Schinus terebenthifolius Raddi (AROEIRA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, 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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Vânia A. Vicente

CURITIBA
2010



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

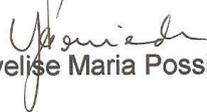
**"Atividade antimicrobiana de endófitos e extratos foliares de
Schinus terebenthifolius Raddi (aroeira)"**

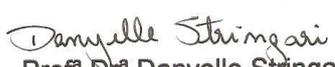
por

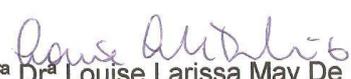
FABIANA TONIAL

**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^a Dr^a Chirlei Glienke (presidente)


Prof^a Dr^a Yvelise Maria Possiede


Prof^a Dr^a Danyelle Stringari


Prof^a Dr^a Louise Larissa May De Mio

Curitiba, 30 de março de 2010.

Aos meus pais, Jenoino Tonial e Maria Alda M. Tonial,
meus irmãos, Leandro, Leonardo e Milton, e
ao meu namorado, Luciano,
por tudo que me ajudaram a conquistar.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, compreensão e incentivo.

Ao meu namorado por nunca me deixar desistir e por acreditar em meu potencial.

À Prof^a Dr^a Chirlei Glienke e à Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente pela oportunidade que me deram em conquistar algo que nunca imaginei ser possível, pelos ensinamentos e pela confiança.

À Prof^a Dr^a Beatriz Helena L. de Noronha Sales Maia por estar sempre disposta a ajudar e contribuir com o trabalho.

À Prof^a Dr^a Selma F.Z. Baggio pelo apoio, sugestões e auxílio.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pelos valiosos ensinamentos.

À doutoranda Josiane Figueiredo por ser a primeira pessoa a me receber no LabGeM e pela ajuda com o isolamento dos endofíticos.

À pesquisadora Danyelle Stringari pela disposição em me ajudar com os seqüenciamentos.

À aluna do Curso de Farmácia Talissa pela ajuda com os pareamentos, às mestrandas Lisandra e Angela pela ajuda no seqüenciamento e por sofrerem comigo a dificuldade em se conseguir usar o sequenciador, ao aluno de biologia Douglas A. pela ajuda nas extrações de DNA. À doutoranda Nelissa pela grande ajuda no laboratório de química.

À mestranda Patricia Araujo Lopez não só por ter me ensinado muito do que sei em microbiologia, mas por ter se tornado uma grande amiga.

A todos os meus colegas mestrandos que foram minha segunda família por estes dois anos.

As equipes do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Genética de Microrganismos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*"Não existe grandeza onde não há
simplicidade, bondade e verdade."*

Leon Tolstói

RESUMO

A pesquisa de compostos químicos biologicamente ativos para fins terapêuticos em plantas utilizadas na medicina popular e em seus microrganismos endofíticos tem enriquecido as opções terapêuticas com novos fármacos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitumorais, entre outros. Em busca de soluções para o avanço das bactérias multiresistentes o presente trabalho buscou a confirmação científica para o uso popular de *Schinus terebenthifolius* Raddi, aroeira, como antimicrobiano e ampliou o estudo buscando a relação desta atividade aos seus endófitos. Para isto foi avaliada a atividade antimicrobiana e a composição química do extrato metanólico bruto das folhas da planta, assim como suas frações. Paralelamente, foram isolados fungos filamentosos e actinomicetos endofíticos das folhas da mesma árvore, que foram confrontados com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura de interesse clínico e um fitopatógeno filamentoso para verificar o potencial de produção de compostos antimicrobianos por esses microrganismos. Os endófitos com este potencial foram selecionados para fermentação a fim de extrair seus metabólitos secundários ativos. Aqueles que apresentaram bons resultados também foram avaliados quimicamente e comparados com o extrato obtido diretamente das folhas da planta e suas frações. O extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações de diclorometano:acetato de etila (1:1) e de acetato de etila foram ativos contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Ainda, o extrato bruto da planta inibiu em mais de 40% o crescimento do fitopatógeno *Guignardia citricarpa*. Alguns dos compostos extraídos dos endófitos também apresentaram atividade contra pelo menos um dos microrganismos testados (*Staphylococcus aureus* - ATCC 27213, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 e *Candida albicans* - ATCC 10231). Foram encontrados nove microrganismos endofíticos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, entre eles foram identificados os gêneros *Alternaria*, *Phomopsis*, *Penicillium* e *Streptomyces*, um basidiomiceto também apresentou a mesma propriedade. De acordo com a análise química por cromatografia em camada delgada sugere-se que os metabólitos ativos da planta estejam relacionados com compostos fenólicos e/ou antraquinonas, enquanto a atividade antimicrobiana dos endófitos testados parece estar vinculada à produção de alcalóides, presente em todos os extratos ativos dos microrganismos. Dois extratos com atividade produzidos por endófitos também apresentaram antraquinonas e um terpenóide. Nas condições testadas não foi encontrada relação entre os compostos com atividade antimicrobiana extraídos das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi com os extraídos dos fungos e actinomiceto isolados desta mesma planta. Entretanto, esta diversidade de vias metabólicas secundárias ressalta a importância da pesquisa destas duas fontes de metabólitos secundários biologicamente ativos.

Palavra-chave: *Schinus terebenthifolius* Raddi, endófitos, *Streptomyces* sp., antimicrobiana, *Guignardia citricarpa*

ABSTRACT

The search for biologically active compounds for therapeutic purposes in plants used in popular medicine and their endophytic microorganisms has enriched the therapeutic options with new anti-inflammatory, antimicrobial, antitumor drugs among others. In the search for solutions for the advancement of bacteria multiresistance, this study aims to confirm scientifically the popular use of *Schinus terebenthifolius* Raddi as an antimicrobial and to seek the relationship of this activity to its endophytes. In order to do so, the antimicrobial activity and chemical composition of a crude methanol extract of *S. terebenthifolius* leaves and its fractions were studied. Also, endophytic fungi and actinomycetes from leaves of the same tree were isolated, which were then tested against Gram-positive, Gram-negative bacteria, a yeast of clinical interest and a filamentous pathogen to investigate their potential production of antimicrobial compounds. Isolates showing this potential were selected to undergo fermentation in an attempt to extract their active secondary metabolites. Those who presented positive results were also evaluated chemically and compared with the extract and fractions from leaves of the plant. The crude extract and fractions (dichloromethane:ethyl acetate (1:1) and ethyl acetate) of *S. terebenthifolius* were active against *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Candida albicans* (ATCC 10231). Besides, the crude extract of the plant inhibited more than 40% growth of the phytopathogen *Guignardia citricarpa*. Some compounds extracted from endophytes also showed activity against at least one of the microorganism tested (*Staphylococcus aureus* - ATCC 27213, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 e *Candida albicans* - ATCC 10231). Nine endophytic microorganisms with the ability to produce secondary metabolites with antimicrobial activity were found and identified as *Alternaria*, *Phomopsis*, *Penicillium*, *Streptomyces* and a basidiomycete. According to chemical analysis by thin layer chromatography it was suggested that the active metabolites of the plant are related to phenolic compounds and/or anthraquinones, while the antimicrobial activity of endophytes appears to be linked to the production of alkaloids, present in all the active extracts of the microorganisms. Two active extracts produced by endophytes also presented anthraquinones and terpenoids. Under the conditions tested, a relation between antimicrobial activity of *S. terebenthifolius* and the compounds from fungi and actinomycete isolated from the same plant was not found. However, this diversity of secondary metabolic pathways emphasizes the importance of the research of these two sources of biologically active secondary metabolites.

Key words: *Schinus terebenthifolius* Raddi, endophytes, *Streptomyces* sp., antimicrobial, *Guignardia citricarpa*

LISTA DE SIGLAS

AC	- Meio Seletivo para Actinomiceto
ANOVA	- Análise de Variância
BDA	- Batata Dextrose Ágar
CBA	- Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	- Caldo Müller-Hinton
CMI	- Concentração Inibitória Mínima
DGR	- Reativo de Dragendorff
DIC	- Delineamento Inteiramente Casualizado
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FeCl ₃	- Cloreto Férrico
KOH	- Hidróxido de Potássio
LabGeM	- Laboratório de Genética de Microrganismos - UFPR
MEA	- Ágar Extrato de Malte
MHA	- Ágar Müller-Hinton
MTT	- 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2.5-diphenyl-2Htetrazoliumbromide
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	- Polietilenoglicol
SDS	- Solução de Lauril Sulfato de Sódio
TBE	- Solução de Tris, Borato e EDTA
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNESCO	- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UPCB	- Herbário do Departamento de Botânica da UFPR
VAS	- Vanilina Sulfúrica Ácida
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	17
2.1.1 Dados botânicos.....	17
2.1.2 Aspectos gerais	19
2.1.3 Uso na medicina popular.....	20
2.1.4 Atividades cientificamente comprovadas.....	21
2.1.4.1 <i>Antitumoral</i>	21
2.1.4.2 <i>Antioxidante</i>	21
2.1.4.3 <i>Cicatrizante</i>	22
2.1.4.4 <i>Antiinflamatória</i>	23
2.1.4.5 <i>Antimicrobiana</i>	23
2.1.5 Compostos químicos	25
2.2 Microrganismos endofíticos	30
2.2.1 Atividade biológica dos endófitos	33
2.2.1.1 <i>Atividade de fungos endofíticos</i>	33
2.2.1.2 <i>Atividade de bactérias endofíticas</i>	34
2.2.1.2.1 <i>Atividade de actinomicetos endofíticos</i>	34
2.2.2 Endófitos relacionados com <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	35
2.3 Metabólitos secundários	36
2.3.1 Fermentação	38
2.4 Fitopatógenos	38
2.4.1 Controle biológico.....	39
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 METODOLOGIAS	41
4.1 Meios de cultura	41
4.1.1 Caldo Müller-Hinton (CMH)	41
4.1.2 Meio Ágar Extrato de Malte (MEA).....	41
4.1.3 Meio Ágar Müeller Hinton (MHA).....	41
4.1.4 Meio Czapeck.....	42

4.1.5 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA).....	42
4.1.6 Meio MPE.....	42
4.1.7 Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC).....	43
4.2 Soluções	43
4.2.1 Reativo de Dragendorff	43
4.2.2 Solução de Anisaldeído.....	44
4.2.3 Solução de Hidróxido de Potássio.....	44
4.2.4 Solução de Ninidrina	44
4.2.5 Solução de Vanilina Sulfúrica Ácida.....	44
4.3 Exemplar botânico	44
4.4 Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e de suas frações obtidas a partir das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	45
4.4.1 Coleta do material botânico e obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	45
4.4.2 Fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	45
4.4.3 Ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e de suas frações	46
4.4.3.1 Método dos poços	46
4.4.3.2 Método da macrodiluição	47
4.5 Isolamento de endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	48
4.6 Identificação dos microrganismos endofíticos isolados das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	49
4.6.1 Extração de DNA.....	49
4.6.2 Seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA para os fungos e de parte da região 16S do rDNA para o actinomiceto	51
4.7 Atividade antimicrobiana dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	54
4.7.1 Seleção dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi para a extração dos metabólitos secundários	54
4.7.2 Obtenção de metabólitos secundários a partir dos endófitos isolados das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	56
4.7.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos isolados das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	57
4.7.3.1 Avaliação dos compostos extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos endófitos.....	57
4.7.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto endofíticos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	59

4.7.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo dos endófitos após a extração com acetato de etila	59
4.8 Comparação química entre os compostos ativos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi com os compostos ativos dos endófitos	60
4.9 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e de suas frações	62
5.1.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	62
5.1.2 Ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e de suas frações	63
5.1.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações pelo método dos poços	63
5.1.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações pelo método da macrodiluição	65
5.2 Isolamento dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	67
5.3 Identificação dos microrganismos endofíticos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	67
5.4 Seleção dos endófitos para a extração dos metabólitos secundários	75
5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos	77
5.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos microrganismos endofíticos pelo método de bioautografia	77
5.5.2 Avaliação da atividade dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos microrganismos endofíticos das folhas de aroeira contra <i>Guignardia citricarpa</i>	81
5.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto pelo método dos poços	84
5.5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo após a extração com acetato de etila	86
5.6 Caracterização química dos compostos ativos do extrato metanólico bruto das folhas de aroeira e suas frações e dos metabólitos ativos extraídos dos endófitos das folhas de aroeira	87
6 DISCUSSÃO	92
6.1 Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e de suas frações obtido a partir das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	92
6.1.1 Obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e seu fracionamento	92

6.1.2 Ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e de suas frações	93
6.1.2.1 Método dos poços	94
6.1.2.2 Método da macrodiluição	96
6.2 Isolamento dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi....	98
6.3 Identificação dos microrganismos endofíticos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	99
6.4 Seleção dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi para a extração dos metabólitos secundários.....	101
6.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos.....	102
6.5.1 Obtenção de metabólitos secundários a partir dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi.....	102
6.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi pelo método de bioautografia	103
6.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi contra <i>Guignardia citricarpa</i>	104
6.5.4 Avaliação dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto endofíticos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	105
6.5.5 Avaliação dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo após a extração com acetato de etila.....	106
6.6 Comparação química entre os compostos ativos do extrato metanólico bruto das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi e suas frações com os compostos ativos dos endófitos das folhas de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	107
7 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	112
APÊNDICES	133

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com finalidade terapêutica, conhecida como fitoterapia, é uma rica tradição medicinal conservada por povos de diferentes países, destacando-se o uso no tratamento de doenças venéreas, inflamações, infecções, feridas e gastroenterites (GUERRA *et al.*, 2000; RAMIREZ; DIAZ, 2007; FERRO; ALVARENGA, 2000). Aproximadamente 25% dos fármacos lançados no mercado são provenientes de fitoterápicos (YBARRA *et al.*, 2005). A fitoterapia é considerada uma alternativa ao uso de medicamentos sintéticos, geralmente considerados mais caros e agressivos ao organismo. Porém, é importante ressaltar que, quando não utilizadas corretamente, incluindo dosagem, forma e via de administração, intervalos entre as doses, podem oferecer riscos à saúde. Os fitoterápicos também podem desencadear reações alérgicas, efeitos tóxicos, mutagênicos e interações medicamentosas. O Brasil abriga 20% das 250 mil espécies de plantas medicinais catalogadas pela UNESCO, sendo sua flora bastante explorada, não apenas pelos brasileiros (DRUMOND *et al.*, 2004).

A seleção de linhagens microbianas resistentes aos atuais antibióticos é considerada uma preocupação mundial. Dados publicados pela *World Health Organization (WHO)* advertem que 90% dos isolados de algumas espécies bacterianas são resistentes a agentes antimicrobianos antigamente considerados fármacos de primeira escolha e que, em alguns países, a resistência de *Escherichia coli* às fluoroquinolonas já excede 50% dos isolados, reduzindo as chances de prover um tratamento eficaz ao paciente (OMI, 2009). Este panorama exige a investigação de novas substâncias antimicrobianas. Uma possível fonte para minimizar este problema são as plantas chamadas de medicinais. A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais e de produtos naturais de plantas superiores está relacionada, principalmente, com a produção de metabólitos secundários com atividade biocida (bactericida, fungicida e inseticida), ressaltando a importância da investigação científica de espécies popularmente utilizadas (SALGADO *et al.*, 2005; RAMIREZ; DIAZ, 2007).

A descoberta dos endófitos ampliou as chances de serem extraídos novos agentes antimicrobianos a partir dos líquidos metabólicos destes microrganismos. É

exatamente isso que vem sendo observado, como o exemplo da Kanamicina, um antibiótico já no mercado que foi extraído de um actinomiceto endófito por Castillo *et al.* (2003). Aliar os conhecimentos fitoterápicos com o estudo dos endófitos pode ser a chave para a descoberta de novas substâncias que possam conter, pelo menos por um período de tempo, o avanço da multiresistência dos microrganismos patogênicos.

Dentre as plantas tradicionalmente usadas pelo efeito antimicrobiano destacamos o uso de *Schinus terebenthifolius* Raddi. Esta planta, pertence à família *Anacardiaceae*, é popularmente chamada de aroeira, aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha, aroeira mansa, aroeira do brejo, aroeira do sertão, fruto de raposa, aroeira de sabiá, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira do Paraná, aguaraiba e careiba (SATSI; LIMA, 2002; LIMA *et al.*, 2004; RIBAS *et al.*, 2006; LORENZI, 2002). É originária da América do Sul, especialmente do Brasil, do Paraguai e da Argentina e foi introduzida na Europa para a arborização de ruas pelo seu porte e beleza (GUERRA *et al.*, 2000; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PARDO, 2005; RIBAS *et al.*, 2006; LORENZI, 2002).

As partes desta planta utilizadas na medicina popular por apresentarem propriedades medicinais são: a casca, as folhas e os frutos (BORNHAUSEN, 2002). Martines, Alonso e Betancourt (1996) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato fluido (etanólico a 30%) de folhas de *S. terebenthifolius* Raddi e observaram inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Outro estudo também utilizou preparações das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato fluido (etanólico) a 80% e encontrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (GUERRA *et al.*, 2000). Lima *et al.* (2004) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. terebenthifolius*, obtido de caules e folhas e verificaram atividade frente às linhagens referência de *S. aureus* ATCC6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Bacillus cereus* ATCC14579, *P. aeruginosa* ATCC10145, *C. albicans* ICB12, *Trycophyton rubrum* LM54, *Microsporum canis* LM72 e *Ephydermophyton flocosum* LM27, utilizando o teste de difusão em ágar. Segundo os autores a atividade antimicrobiana possivelmente está associada a compostos químicos como

taninos, e outros de menor quantidade como alcalóides, esteróides, chalcones e urundeuvinas.

Em 1996, uma patente americana foi criada para um produto feito com o óleo essencial de aroeira brasileira, *Schinus terebenthifolius*, um remédio tópico para seres humanos e animais de ação bactericida utilizado contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A mesma companhia criou outra patente em 1997 para um preparado similar, usado para limpeza de pele e de ação bactericida (PLANTAS QUE CURAM, 2008).

A presença de endófitos na planta em estudo pode estar relacionada com a sua atividade fitoterápica através da produção de metabólitos secundários pelos microrganismos, sendo que um estudo já associou a variação na produção de fitoquímicos com a variação da microbiota desta planta (LIMA, 2008). Tendo por base esta excepcional característica antimicrobiana e o reduzido conhecimento dos compostos químicos relacionados com esta ação e da microbiota endofítica de *S. terebenthifolius* Raddi este trabalho se justifica no atual panorama de resistência antimicrobiana mundial. Assim, o principal objetivo deste trabalho é correlacionar a atividade antimicrobiana das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi com os microrganismos endofíticos (fungos e actinomicetos) nela presentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Schinus terebenthifolius* Raddi

Schinus terebenthifolius Raddi é um exemplar da família *Anacardiaceae* que apresenta as seguintes sinonímias botânicas: *Schinus aroeira* Vell, *Sarcotheca bahiensis* Turcz., *Schinus antiarthritica* Mart., *Schinus mucromulata* Mart. *Schinus chichita* Speg., *Schinus lentiscifolia* e *Schinus rhoifolus* Mart. (LORENZI, 2002). Popularmente esta árvore é conhecida como aroeira, aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha, aroeira mansa, aroeira do brejo, aroeira do sertão, fruto de raposa, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira do campo, aroeira de sabiá, aroeira do Paraná, aguaraiaba e careiba (LORENZI, 2002; SATSI; LIMA, 2002; LIMA *et al.*, 2004; RIBAS *et al.*, 2006).

2.1.1 Dados botânicos

Schinus terebenthifolius Raddi é uma árvore que atinge de 5-12m de altura com um tronco tortuoso, revestido por uma casca grossa, de 30-60cm de diâmetro, de onde saem ramos principais repletos de ramos secundários. Sua copa é bonita e arredondada (LORENZI, 2002). Esta descrição pode ser visualizada na FIGURA 1.

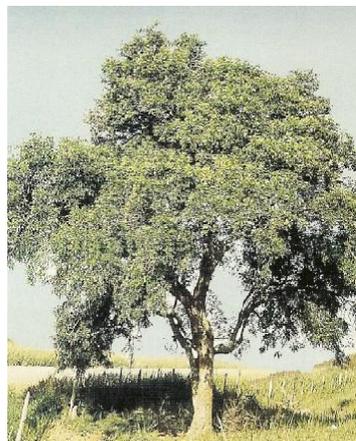


FIGURA 1 – ÁRVORE DE *Schinus terebenthifolius* Raddi
FONTE: LORENZI (2002).

Nos ramos secundários há folhas compostas imparipinadas, fortemente aromáticas, com 3-10 pares de folíolos glabros. De setembro a janeiro apresenta inflorescências paniculadas terminais, com flores pequenas e esbranquiçadas. As flores da aroeira são diclinas, dependente basicamente de insetos para o transporte do pólen, e o comprimento e a largura da inflorescência determinam o dimorfismo sexual da planta (LENZI; ORTH, 2004). A FIGURA 2 ilustra tal descrição.

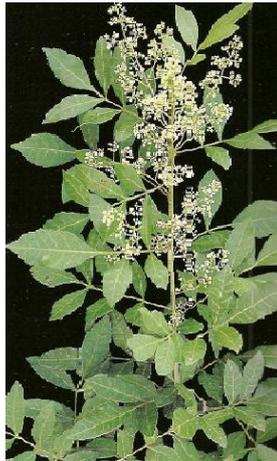


FIGURA 2 – FOLHAS E INFLORESCÊNCIA DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
FONTE: LORENZI (2002).

Os frutos aparecem predominantemente de janeiro a julho, possuem características de drupas globosas, vermelhas e brilhantes quando maduros (FIGURA 3) (LORENZI, 2002; STASI; LIMA 2002).

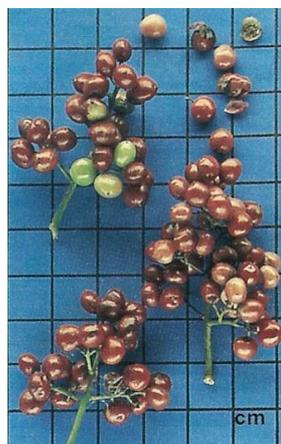


FIGURA 3 – FRUTOS MADUROS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
FONTE: LORENZI (2002).

A semente de *Schinus terebenthifolius*, única por fruto, é reniforme, com envoltório membranáceo, liso, de coloração amarelo-clara e com uma mancha marrom escura. Ela possui reservas de proteínas e de lipídeos e apresenta um envoltório com dupla origem, um parcialmente paquicalazal (se manifesta externamente como uma mancha marrom escura) e o outro tegumentar (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1999).

2.1.2 Aspectos gerais

É uma planta originária da América do Sul, especialmente do sul do Brasil, do Paraguai e da Argentina. Devido seu pioneirismo e agressividade ocorre em diversas formações vegetais, incluindo terrenos secos e pobres, apesar de se adaptar melhor a beira de rios, córregos e várzeas úmidas (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI 1999; LORENZI, 2002; MORGAN; OVERHOLT, 2005). Esta característica permitiu sua distribuição em todo o território brasileiro e sua presença em variados países como Peru, Uruguai, Chile, Bolívia e nos continentes europeu e asiático (RIBAS *et al.*, 2006). Foi introduzida na Europa para a arborização de ruas pelo seu porte e beleza. Na França os seus frutos são utilizados na culinária, sendo conhecidos como *poivre rose*, um tipo de pimenta doce; seu cheiro é resinoso e o sabor é adstringente (devido ao tanino) e balsâmico (SCRIVANTI; ZUNINO; ZYGADLO, 2003; CERUKS *et al.*, 2007; PLANTAS QUE CURAM, 2008).

Schinus terebenthifolius Raddi fornece madeira parda ou amarelo-clara, mole, porém moderadamente pesada, bastante resistente e de grande durabilidade natural (fato que suscita a suspeita de atividade antimicrobiana e antifúngica), aproveitada para esteios, mourões, lenha e carvão, forragem para abelhas e cabras, cercas vivas e arborização para pastos (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1999; STASI; LIMA, 2002; LORENZI, 2002; SANTOS *et al.*, 2007). As cascas são utilizadas na extração de taninos para a indústria de curtimento de couro (JORGE; MARKMANN, 1996). Também é muito usado como planta ornamental, sendo indicado para arborização de ruas estreitas, apesar de poder causar alergia a pessoas sensíveis que entram em contato com as suas folhas; ainda, pode ser usada para reflorestamento (LORENZI, 2002).

2.1.3 Uso na medicina popular

Relata-se o uso de folhas, frutos e casca de *Schinus terebenthifolius* Raddi na terapêutica popular (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PARDO, 2005). As folhas são usadas como cicatrizante de pele ou mucosa, analgésico e antipruriginoso através do uso externo de seu macerado. A administração interna da infusão das suas folhas é indicada para o reumatismo. Mastigar as folhas frescas da aroeira auxilia no tratamento de gengivites e na cicatrização da mucosa. As cascas e folhas secas da aroeira são utilizadas contra febres, diarreias, úlcera gastroduodenal, blenorragia, tosse e bronquite, problemas menstruais com excesso de sangramento, gripes, inflamações em geral e problemas do trato geniturinário, incluindo doenças venéreas, cistites e uretrites. Banhos das cascas de aroeira são indicados para o alívio da gota, reumatismo e dor ciática (MARTINES; ALONSO; BETANCOURT, 1996; PLANTAS QUE CURAM, 2008). O extrato etanólico, preparado a partir da entrecasca, é utilizado como cicatrizante de feridas cutâneas (HOFFMAN *et al.*, 2006). Da casca extrai-se óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PARDO, 2005). Compressas intravaginais com o extrato aquoso desta planta são usadas para tratar cervicite e cervicovaginites (MARTINES; ALONSO; BETANCOURT, 1996). Sua resina é indicada para o tratamento de reumatismo e ínguas, além de servir como cicatrizante, analgésico, purgativo e combater doenças respiratórias (bronquite, tosse). A resina amarelo-clara proveniente das lesões das cascas é amplamente utilizada, entre os sertanejos, como tônico. No Brasil, a resina, casca, folhas e frutos são utilizados para o tratamento de tumores. A aroeira foi utilizada pelos jesuítas que, com sua resina, preparavam o "Bálsamo das Missões", famoso no Brasil e no exterior. Um preparado dos frutos de *S. terebenthifolius* Raddi é utilizado para azia e gastrite (PLANTAS QUE CURAM, 2008). O suco do macerado de raízes é utilizado para o tratamento de tumores ganglionares (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007). A planta inteira é utilizada, externamente, como anti-séptico no caso de fraturas e feridas expostas. Também são relatadas ações adstringente, antioxidante (fruto) e antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2007). Em homeopatia, a planta é utilizada para o tratamento da debilidade, intumescimento linfático, inércia sexual e moléstias de pele (STASI; LIMA, 2002).

É importante ressaltar que todas as propriedades anteriormente descritas provêm da cultura popular, sendo que algumas delas já foram comprovadas cientificamente, porém outras não. Além disso, apesar dos efeitos benéficos a aroeira apresenta vários efeitos tóxicos, especialmente sob uso prolongado, o que exige cautela em sua utilização como fitoterápico. Entre os efeitos tóxicos destacam-se a dermatite alérgica em pessoas sensíveis a alquilofenóis e a atividade mutagênica (citotóxica) detectada em extratos provenientes das cascas do caule (STASI; LIMA, 2002; BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007; PLANTAS QUE CURAM, 2008).

2.1.4 Atividades cientificamente comprovadas

2.1.4.1 Antitumoral

Foi comprovado que a fração de polifenóis resultante da purificação de um extrato das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi possui atividade antiproliferativa e antitumoral sobre células prostáticas cancerosas, provavelmente por estes compostos atuarem em enzimas lisossômicas destas células e, conseqüentemente, induzirem a apoptose (QUEIRES *et al.*, 2006).

2.1.4.2 Antioxidante

Tanto o extrato alcoólico como o extrato aquoso dos frutos da aroeira apresentam boa atividade antioxidante associada à presença de compostos fenólicos nas amostras (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; SANTOS, 2004). Velázquez *et al.* (2003), observaram que o extrato metanólico de *Schinus terebenthifolius*, entre outras plantas, protegeu a peroxidação lipídica enzimática e não-enzimática em membranas microssomais de ratos, sendo que esta planta

mostrou uma das maiores atividades nos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e superóxido.

2.1.4.3 Cicatrizante

Em 2006, Ribas *et al.* verificaram um fechamento epitelial acelerado de lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal de ratos tratados com extrato das folhas de *Schinus terebentifolius* Raddi em relação ao grupo controle, além de uma maior proliferação vascular e fibroblástica. No mesmo ano, Hoffman *et al.* (2006) observaram que a administração intraperitoneal do extrato hidroalcoólico de aroeira favoreceu a cicatrização, em nível microscópico, de anastomoses de cólon em ratos experimentais. Em outro estudo, realizado por Nunes *et al.* (2008), a ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebentifolius* Raddi, injetado intraperitonealmente, foi evidenciada pelo aumento de fibroblastos na sutura da parede abdominal de ratos e por induzir um aumento da carga máxima de ruptura e deformação máxima da linha alba na análise tensiométrica. Porém, os mesmos autores relatam que macroscopicamente a cicatrização não foi alterada comparando-se o grupo controle e o tratado (NUNES *et al.*, 2008). Experimentos realizados por Santos *et al.* (2006) e por Branco Neto *et al.* (2006) não confirmam a atividade cicatrizante dos extratos hidroalcoólicos de aroeira. Um deles avaliou a cicatrização de ferida provocada no estômago de ratos tratada com extrato hidroalcoólico de aroeira e não observou alteração no processo de cicatrização do estômago quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microscópica (SANTOS *et al.*, 2006). O outro estudo, que avaliou o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorsocostal de ratos, concluiu que este extrato retardou a reepitelização das feridas da pele das cobaias (BRANCO NETO *et al.*, 2006).

2.1.4.4 Antiinflamatória

No mesmo estudo em que Ribas *et al.* (2006) observaram o efeito cicatrizante do extrato da aroeira, os autores obtiveram resultados que sugerem que o extrato de *Schinus terebenthifolius* Raddi diminui rapidamente a intensidade do processo inflamatório crônico. Este resultado se deve ao fato do extrato atuar no reparo do tecido conjuntivo, diminuindo rapidamente a intensidade do processo inflamatório crônico e da angiogênese e por acelerar a maturação do colágeno.

2.1.4.5 Antimicrobiana

Diversos trabalhos já confirmaram a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Schinus terebenthifolius* Raddi. Degáspari, Waszczyński e Pardo (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos, aquoso e alcoólico, obtidos de frutos de *Schinus terebenthifolius* e a relacionaram com compostos fenólicos presentes nestas amostras. Os autores verificaram que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Bacillus cereus* ATCC 11778, apresentando quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico. Porém, o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos testados e possuía apenas a flavanona naringina. Ao contrário deste estudo, Lima *et al.* (2004) verificaram a atividade do extrato aquoso de *S. terebenthifolius* contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans*. Os autores discutem que esta atividade antibacteriana e antifúngica está, possivelmente, associada à presença de certos compostos químicos, em especial de taninos, além de compostos presentes em menor quantidade, como os alcalóides, esteróides, chalcones e urundeuvinas. Outro autor destaca a falta de atividade destes extratos contra *Escherichia coli* (LIMA *et al.*, 2006).

Mais estudos visaram elucidar a propriedade antimicrobiana da aroeira utilizando extratos etanólicos da planta, um deles utilizando uma concentração de

30% (MARTÍNES; ALONSO; BETANCOURT, 1996) e outro utilizando uma concentração de 80% (GUERRA *et al.*, 2000). Ambos os autores relatam atividade inibitória contra bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Martínes, Alonso e Betancourt (1996) relatam atividade contra *B. cereus* (Gram-positivo). O fato que diferenciou estes dois estudos foi a resposta antifúngica, testada com *C. albicans*, a qual só foi efetiva com o extrato etanólico a 80%, possivelmente por permitir uma maior concentração do(s) composto(s) com atividade farmacológica no extrato.

Um levantamento bibliográfico etnobotânico sobre plantas utilizadas para infecções fúngicas na medicina popular destaca o uso de *S. terebentifolius* Raddi dentre 409 espécies de plantas (FENNER *et al.*, 2006). Outra pesquisa relacionada com a propriedade antifúngica desta planta testou seus extratos, aquoso e alcoólico, contra *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus neoformans*. O resultado foi de atividade contra *C. albicans* com o uso do extrato aquoso, porém quando as macromoléculas foram separadas de outros metabólitos houve perda de atividade (SCHMOURLO *et al.*, 2005). Um trabalho relacionado com a atividade antimicrobiana de um extrato de *Schinus terebentifolius* Raddi também verificou que o fracionamento do mesmo induzia a perda da capacidade de inibição de bactérias (BOROS, 2007). Johann *et al.* (2007) verificaram que o extrato etanólico das folhas de *Schinus terebentifolius* apresentou potencial atividade antifúngica contra *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii*. Neste mesmo estudo a análise fitoquímica preliminar dos extratos de *S. terebentifolius* mostrou a presença de compostos biologicamente ativos como flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos.

Há certas contradições no espectro de ação dos extratos até aqui descritos, porém a atividade antimicrobiana de extratos de *Schinus terebentifolius* Raddi é inquestionável.

Já foi desenvolvido um gel de aroeira específico para o tratamento da vaginose bacteriana, o qual teve sua eficácia e segurança comprovadas e também apresentou efeitos benéficos sobre a microbiota vaginal (AMORIM; SANTOS, 2003).

O uso odontológico da ação antimicrobiana da aroeira também tem sido bastante explorado. Soares *et al.* (2006) testaram a susceptibilidade *in vitro* da tintura de aroeira sobre bactérias bucais (*S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 2575, *S. sobrinus* ATCC 27609, *S. mitis* ATCC 9811, *S. sanguis* ATCC 10557 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469) e destacaram a atividade da aroeira

contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *L. casei*. Boros (2007) verificou que o uso do extrato hidroalcoólico de *S. terebentifolius* Raddi como medicação endodôntica pode ser eficiente na inibição e controle bacteriano. Outro estudo concluiu que a tintura de aroeira (20%) apresentou atividade antibacteriana *in vitro* sobre *S. mutans* e foi eficaz na redução da contaminação de escovas dentais contaminadas por este microrganismo (SOARES *et al.*, 2007).

2.1.5 Compostos químicos

Um estudo fitoquímico de *Schinus terebentifolius* Raddi, realizado em 1974 por Marsaioli, revelou a presença dos compostos: ácido masticadienônico, schinol, baueren-28-carboxi-3-ona, β -sitosterol, α -amirina, bauerenona, simiarinol, n-triacontano e outros compostos de cadeia longa, isolados do extrato benzênico da casca e das folhas de *Schinus terebentifolius*. Ainda, a presença de bauerenol e de α -amirinona foi sugerida.

Segundo Jorge e Markmann (1996), as folhas e as cascas de *S. terebentifolius* Raddi revelaram-se ricas em taninos e em óleo essencial, enquanto as saponinas são restritas às cascas. Ainda, no mesmo trabalho, foi verificado que a composição fenólica das cascas é diferente da composição fenólica das folhas (JORGE; MARKMANN, 1996).

Queires; Rodrigues (1998) quantificaram as substâncias fenólicas presente nos órgãos totais de *S. terebentifolius* Raddi com a justificativa de que muitas das atividades desta planta são atribuídas a polifenóis que pertencem a sua constituição estrutural. Os autores observaram uma distribuição irregular dos compostos entre os órgãos da planta, sendo que dentre os órgãos vegetativos da planta as folhas apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, o que demonstra a importância da utilização da porção correta da árvore para a obtenção de determinada atividade.

Os compostos fenólicos são substâncias contendo um anel aromático com uma ou mais hidroxilas (-OH). Há vários grupos de compostos fenólicos, entre eles flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácido benzóico, cinâmico e seus derivados), fenóis simples (pouco presentes na natureza),

cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Dentre os polifenóis os que se destacam pela atividade antimicrobiana são os taninos e os flavonóides, principalmente os isoflavonóides. A ação antimicrobiana dos flavonóides, provavelmente está relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como estruturas da parede celular (MOTA *et al.*, 2009). Flavonóides mais lipofílicos podem atuar provocando o rompimento de membranas microbianas. O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses: 1) inibição de enzimas bacterianas e fúngicas e/ou complexação com os substratos dessas enzimas; 2) ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e; 3) complexação com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade daqueles que são essenciais para o metabolismo microbiano. Ácidos fenólicos, como o ácido cinâmico, têm ação antibacteriana, porém, o mecanismo exato é desconhecido. Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário (ANGELO; JORGE, 2007; MOTA *et al.*, 2009).

Dentre os compostos fenólicos isolados de aroeira encontramos a flavona apigenina, o ácido elágico, a flavanona naringina, o galato de etila, o galato de metila, a miricetrina, a miricetina, a quercitrina, a rutina e a isoquercitrina (MARSAIOLI, 1974; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005; QUEIRES *et al.*, 2006; CERUKS *et al.*, 2007). Dos compostos descritos vários já foram correlacionados com atividade antimicrobiana, alguns destes estudos são descritos na seqüência.

A apigenina já foi encontrada em outros extratos ativos de plantas medicinais, incluindo o extrato antiviral de *Lamiaceae* (REICHLING *et al.*, 2008), em extrato antimicrobiano de *Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa, que também continha o flavonóide rutina (PEREIRA *et al.*, 2007), em extratos de alcaparra com atividade contra microrganismos causadores de doenças intestinais e respiratórias (SOUZA *et al.*, 2006), no chá das flores de camomila (MCKAY; BLUMBERG, 2006). Em 1999, a atividade da apigenina contra bactérias Gram-negativas foi comprovada (BASILE *et al.*, 1999), e a atividade do composto contra bactérias Gram-positivas e *Trypanossoma cruzi* foi descrita com a extração da apigenina de *Moquinia kingii* (SCHINOR *et al.*, 2004). Ainda foi verificado que a apigenina previne a ativação do vírus HIV-1 (CRITCHFIELD; BUTERA; FOLKS¹ citados por CUSHNIE; LAMB, 2005),

¹ CRITCHFIELD, J.W.; BUTERA, S.T.; FOLKS, T.M. **Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds.** AIDS Res. Hum. Retroviruses. v.12, p.39–46, 1996.

um dos mecanismos de ação da apigenina está relacionado com a inibição da DNA girase, porém o nível da atividade sugere que há outro mecanismo envolvido (OHEMENG *et al.*¹ citados por CUSHNIE; LAMB, 2005).

O ácido elágico também já teve sua atividade antimicrobiana comprovada contra *Helicobacter pylori* (MARTINI *et al.*, 2009); um extrato de *Anogeissus latifolia* contendo ácido gálico e elágico apresentou atividade antibacteriana e antifúngica moderada (GOVINDARAJAN *et al.*, 2006). O extrato antimicrobiano de *Rhizophora mangle L. bark* também continha o ácido elágico (SÁNCHEZ PERERA *et al.*, 2007). A fração fenólica de frutos de *Lonicera caerulea L.*, a qual continha, entre outros, o ácido elágico, reduziu a formação e a adesão em superfície de biofilme de *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (PALÍKOVÁ *et al.*, 2008).

A naringina é uma flavonona tipicamente encontrada em frutas cítricas. Em 2008, sua ação antimicrobiana *in vitro* no crescimento de patógenos incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA), *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* foi demonstrada (TSUI; WONG; RABIE, 2008). Extratos com atividade antimicrobiana de semente e polpa de *Citrus paradisi* Macf. e de rizoma de *Drynaria quercifolia* tiveram como um dos compostos químicos isolados a naringina (RAMESH *et al.*, 2001; CVETNIC; VLADIMIR-KNEZEVIC, 2004).

O galato de etila possui um efeito sinérgico na atividade da tetraciclina, da mupirocina e do ácido fusídico contra *S. aureus* (SOE *et al.*, 2010). O galato de metila é um tanino com atividade comprovada contra *Clostridium perfringens*, *C. paraputrificum*, *Eubacterium limosum*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. thermophilum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* e *Streptococcus faecalis* (AHN *et al.*, 1998; PENNA *et al.*, 2001), possui atividade antifúngica contra *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* e *Puccinia recondita* (AHN *et al.*, 2005). Este composto inibe o crescimento de patógenos orais e a formação de biofilme por *Streptococcus mutans* (KANG *et al.*, 2008); apresenta atividade contra *Salmonella* e um efeito sinérgico na atividade da ciprofloxacina contra este patógeno entérico (CHOI *et al.*, 2008). O metil

¹ OHEMENG, K.A.; SCHWENDER, C.F.; FU, K.P.; BARRET, J.F. **DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones** (1). *Bioorg Med Chem Lett.* v.3, p.225–230, 1993.

galato é um dos compostos ao qual se associa a atividade de *Rhus glabra* (SAXENA *et al.*, 1994).

A propriedade antimicrobiana da miricetrina e da miricetina foi estudada em 1992, quando estes dois compostos foram isolados de *Myrica rubra*, ambos apresentaram atividade contra *S. aureus*, sendo a miricetina a mais eficaz (SHINOHARA; TABATA, 1992). Em um estudo de atividade antimicrobiana de flavonóides contra bactérias resistentes teve como destaque a miricetina, que apresentou atividade contra *S. aureus* resistente a meticilina, *Burkholderia cepacia* multiresistente, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, este trabalho relaciona a atividade do composto com a inibição da síntese de proteínas (XU; LEE, 2001). A atividade antimicrobiana da miricetina também foi relacionada com uma forte inibição na síntese de DNA bacteriano (MORI¹ citado por CUSHNIE; LAMB, 2005). Ainda sobre o mecanismo de ação deste composto foi verificado que ele inibe a atividade das sortases, enzimas relacionadas com o potencial de virulência e infecção por *S. aureus* (KANG *et al.*, 2006). A miricetina também exibiu uma importante atividade sinérgica com os fármacos amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam e cefoxetina contra *K. pneumoniae* - ESBL (LIN; CHIN; LEE, 2005). A atividade da miricetina contra patógenos periodontais Gram-negativos anaeróbios foi verificada com a extração deste composto de um extrato metanólico de *Syzygium aromaticum*, ele teve sua ação comprovada contra *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (CAI; WU, 1996).

O extrato de *Pelargonium radula* foi fracionado e as frações contendo principalmente o flavonóide rutina e outra contendo isoquercitrina como composto principal apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus rettgeri*, *Candida tropicalis* e *Microsporum gypseum*, porém apenas a fração contendo rutina teve atividade contra *Fusarium graminearum* e apenas a com isoquercitrina inibiu *Staphylococcus* sp. (coagulase-negativo) e *Candida lusitanae* (PEPELJNJAK; KALODERA; ZOVKO, 2005). O flavonóide rutina teve atividade semelhante ao antifúngico cloreto de benzalcônio contra o fitopatógeno *Aspergillus ochraceus* (PEREIRA *et al.*, 2008). Um trabalho publicado em 2009 relata a atividade da rutina contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter*

¹ MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. **Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus***. *Phytochemistry*. v.26, p.2231–2234, 1987.

baumannii, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans* e *C. krusei* (ORHAN *et al.*, 2009). A atividade da rutina contra *E. coli* auxiliou na comprovação de que este composto é um inibidor da topoisomerase tipo II (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Com o auxílio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram estudados os óleos essenciais da aroeira, detectando como componentes principais limoneno, α -felandreno, sabinene e camphene (MURRAY *et al.*, 2005). O mesmo trabalho verificou a alta biotoxicidade destes constituintes. Outra análise cromatográfica de óleos essenciais obtidos de frutos da aroeira encontrou sesquiterpenos, como o β -eudesmol e elemol, sobre os quais há relatos de potencial terapêutico contra amnésia induzida por doenças como o Alzheimer (GUROVIC; MARRAY; FERRERO, 2007).

Também há relato da presença de resinas, esteróides, triterpenos, cis-sabinol, p-cimeno, alfa e beta pineno, delta-caroteno e terechutona (PLANTAS QUE CURAM, 2008).

Em 2003, uma pesquisa relacionou os efeitos da poluição do ar na composição de monoterpenos da aroeira e relatou como mudança mais notável o efeito dos níveis de SO₂ sobre estas substâncias químicas. Esta resposta foi associada com o aumento do processo de oxidação da planta, que foi acompanhado pela modificação dos níveis de terpenos (WANNAZ; ZYGADLO; PIGNATA, 2003). Este fato reflete a importância da coleta adequada quando há pretensão do estudo de uma planta ou de sua utilização como fitoterápico, o que pode explicar a não concordância entre alguns estudos.

Schinus terebentifolius Raddi apresenta microrganismos endofíticos, os quais podem estar relacionados com a atividade fitoterápica da planta. Um estudo já associou a variação na produção de fitoquímicos com a variação da microbiota da planta (LIMA, 2008). Ainda no estudo realizado por Lima (2008), os principais gêneros fúngicos isolados das plantas que apresentaram produção de princípios ativos foram *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum* e *Phyllosticta*, porém nas plantas sem produção de princípios ativos os principais gêneros endofíticos isolados foram *Phyllosticta* e *Colletotrichum*.

2.2 Microrganismos endofíticos

As plantas podem apresentar microrganismos, geralmente fungos e bactérias (incluindo actinomicetos), epifíticos e endofíticos. Os microrganismos epifíticos são aqueles encontrados na superfície de tecidos e órgãos vegetais. Os microrganismos endofíticos colonizam, em pelo menos uma etapa de seu ciclo vital, tecidos internos de plantas sem lhes causar prejuízo imediato (BACON; WHITE, 2000; AZEVEDO¹ citado por MELO; AZEVEDO, 1998). A distinção entre estes microrganismos, incluindo fitopatógenos (provocam danos ao hospedeiro), é puramente didática, pois seu estado depende do estágio de desenvolvimento e de condições ambientais e da planta. Fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio intimamente relacionadas com plantas também são considerados microrganismos endofíticos (AZEVEDO¹ citado por MELO; AZEVEDO, 1998).

Os endófitos podem ser transmitidos de uma planta a outra horizontalmente, através de esporos, ou verticalmente, por sementes (SAIKKONEN *et al.*, 1998). Horizontalmente os microrganismos encontram seus hospedeiros por quimiotaxia, eletrotaxia ou acidentalmente (YOU *et al.*, 1995). Com exceção das bactérias que são transmitidas pela semente, os microrganismos endofíticos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou cicatrizes, ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; KOBAYASHI; PALUMBO, 2000). Após a penetração na planta os microrganismos podem permanecer próximos ao local de entrada ou disseminarem-se dentro da planta nos espaços intracelulares ou no sistema vascular (BELL *et al.*, 1995).

Algumas vantagens são atribuídas à presença dos endófitos como: a capacidade deles em produzir antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico; eles podem servir como bioindicadores de vitalidade; têm sido usados como agentes de controle biológico de pragas (bioherbicidas) e doenças; podem ser usados na biorremediação de solos contaminados com poluentes; e são usados como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras (BIZI, 2008).

¹ AZEVEDO, J. L. **Microrganismos Endofíticos.**

A população de endófitos de uma determinada planta pode variar com o estado de saúde da mesma sugerindo uma provável ação protetora de alguns destes microrganismos (REITER *et al.* 2002; YANG; CROWLEY; MENGE, 2001). Este potencial protetor dos endófitos pode ocorrer por competição de espaço e nutrientes na planta, pela produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN; INGEL; CHET, 1995), ou indução de resistência sistêmica (M'PIGA *et al.*, 1997). Um estudo realizado na China verificou que a sazonalidade também interfere na população de endófitos, mostrando que os isolados de amostras coletadas na primavera de *Heterosmilax japonica* Kunth foram mais abundantes dos obtidos no verão (GAO *et al.*, 2005).

Os fungos endofíticos podem produzir substâncias que alteram fenotipicamente a planta protegendo-a (BIZI, 2008; MATIELLO *et al.*, 1997). A variedade morfológica dos fungos endofíticos pode ser visualizada na FIGURA 4.



FIGURA 4 – FUNGOS ENDOFÍTICOS
 FONTE: AZEVEDO *et al.* – COLEÇÃO DE CULTURAS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA (2008)

As bactérias endofíticas, em geral, são encontradas nos espaços intercelulares, pela presença de níveis altos de carboidratos, aminoácidos e nutrientes inorgânicos, porém já foram descritas bactérias endofíticas intracelulares (REINHOLD; HUREK, 1988; MAHAFFEE *et al.*¹ citado por MELO, 2005; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; BACON; HINTON, 2006). O gênero bacteriano mais encontrado como endófito é *Bacillus* (HALLMANN *et al.*, 1997), mas também já foram descritos: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrabacterium*, *Chryseimonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas*, *Sphungomonas* entre outros (GAGNE; PONS; PHILIBERT, 1985; STURZ *et al.*, 1997; ELVIRA-

¹ MAHAFFEE, W.F. *et al.* Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22.

RECUENCO; VAN VUURDE, 2000; OEHRLE *et al.*, 2000). A variedade morfológica das bactérias endofíticas pode ser visualizada na FIGURA 5.



FIGURA 5 – BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
 FONTE: AZEVEDO *et al.* – COLEÇÃO DE CULTURAS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA (2008)

Os actinomicetos pertencem a uma classe de bactérias, actinobactérias, importantes pela ampla produção de metabólitos secundários. Caracterizam-se por serem bactérias Gram-positivas de organização filamentosa, muitas vezes ramificada, semelhante a fungos, inclusive podendo produzir cadeias de esporos semelhantes a conídios. *Streptomyces* spp. são exemplares deste tipo bacteriano bastante estudado, inclusive como endófito (SOUZA *et al.*, 2006). A variedade morfológica dos actinomicetos endofíticos está ilustrada na FIGURA 6.



FIGURA 6 – ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS
 FONTE: AZEVEDO *et al.* – COLEÇÃO DE CULTURAS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA (2008)

A relação dos endófitos com a produção de antibióticos está na presença de metabólitos secundários, que são produtos não essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos, mas que se acumulam no meio de cultura no final da fase exponencial de seu crescimento (MELO, 2005).

2.2.1 Atividade biológica dos endófitos

Vários microrganismos provenientes do interior de tecidos de plantas foram isolados para o estudo de seus metabólitos secundários, os quais podem estar diretamente relacionados com as propriedades medicinais de plantas. A seguir são mencionados exemplos importantes.

2.2.1.1 Atividade de fungos endofíticos

Wiyakrutta *et al.* (2004) estudaram fungos endofíticos provenientes de plantas medicinais da Tailândia, as quais possuíam isolados ativos contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, vírus herpes simples tipo1, células de carcinoma epidermóide oral humano e células de câncer de mama. Em 2000, Wang *et al.* verificaram que o taxol (antitumoral usado clinicamente), produzido pela planta *Taxus mairei*, também poderia ser obtido de um de seus endófitos, o fungo *Tubercularia* sp. Uma substância citotóxica, contra células de tumor epidermóide de nasofaringe, e antifúngica, contra *Candida albicans*, foi extraída do fungo *Neoplaconema napellum*, endofítico de *Hopea hainanensis*, por Wang *et al.* (2006). Isolados fúngicos de *Quercus variabilis* mostraram atividade antifúngica e antibacteriana, sendo que a brefedina A, composto antimicrobiano, foi extraído de um destes endófitos, uma linhagem de *Cladosporium* sp. (WANG *et al.*, 2007). Os mesmos autores, em 2008, também descreveram a atividade de metabólitos secundários de *Penicillium* sp., isolado das folhas de *Hopea hainanensis*, relatando a ação destes contra *C. albicans* e *Aspergillus niger* e também contra um tumor epidermóide. Li *et al.* (2005) realizaram um *screening* das plantas medicinais chinesas na busca de fungos endofíticos com atividade antitumoral e antifúngica, 9,2% dos isolados apresentaram atividade antitumoral e 30% exibiram atividade antifúngica. Lin *et al.*, em 2007, isolaram os fungos endofíticos da planta *Camptotheca acuminata* e relataram que destes 27,6% possuíam atividade contra microrganismos, 4,0% eram citotóxicos e 2,3% faziam inibição da protease. Substâncias anti-*Helicobacter pylori* foram extraídas de fungos

endofíticos da planta medicinal *Cynodon dactylon*. Tais fungos também inibiram o crescimento de *Sarcina lutea*, *S. aureus* e *C. albicans* (LI *et al.*, 2005). As plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*, também tiveram seus fungos endofíticos isolados, dos quais 19 apresentaram atividade antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2004). Em 2005, Sette *et al.* isolaram fungos endofíticos de *Coffea arabica* e *C. robusta* (planta do café) com atividade antimicrobiana contra *Salmonella choleraesuis* (CBMAI 484), *S. aureus* (CBMAI 485), *P. aeruginosa* (CBMAI 489) e quatro sorotipos de *E. coli*. Um isolado de *Aspergillus niger* (IFB-E003), endofítico da planta *Cynodon dactylon*, produziu metabólitos com atividade antitumoral e antimicrobiana (SONG *et al.*, 2004). De uma planta conhecida pela sua atividade contra *Trypanosoma*, *Trixis vauthieri* DC (*Asteraceae*), foi isolado um fungo, *Alternaria* sp., o qual produziu um extrato que inibiu em 99% o patógeno (COTA *et al.*, 2008).

2.2.1.2 Atividade de bactérias endofíticas

Em 2008, Ryan *et al.* publicaram um artigo de revisão que buscou trabalhos que traziam informações a respeito de bactérias endofíticas. Dentro das aplicações destas foram descritas atividades antitumoral, antimicrobiana e antimalária. A ecomicina, um peptídeo antimicótico, foi isolada de uma bactéria (*Pseudomonas viridiflava*) associada à planta, sendo que tal bactéria também pode estar envolvida com a produção de outro antifúngico, a syringotoxina (MILLER *et al.*, 1998). As pseudomicinas, família de antimicóticos, foram extraídas de bactérias endofíticas (*Pseudomonas syringae*) por Harrison *et al.* (1991).

2.2.1.2.1 Atividade de actinomicetos endofíticos

Entre os actinomicetos a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana pelo gênero *Streptomyces* é bastante conhecida e já forneceu ao mercado farmacêutico opções terapêuticas para o tratamento de

infecções bacterianas. 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*. 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 kanamicina, um antibiótico, foi extraído de um *Streptomyces* sp. endofítico de *Grevillea pteridifolia*, por Castillo *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. (FGUIRA *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).

2.2.2 Endófitos relacionados com *Schinus terebentifolius* Raddi

Há pouco estudo sobre a comunidade endofítica da planta *Schinus terebentifolius* Raddi. Strapasson, Santos e Medeiros (2002) isolaram *Fusarium*, *Alternaria*, *Pestalotia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Nigrospora*, *Goetrichum* e *Mucor* como endofíticos de sementes de aroeira. Lima (2008) isolou das folhas de *S. terebentifolius* Raddi fungos do gênero *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Phyllosticta*.

2.3 Metabólitos secundários

O metabolismo secundário, tanto de plantas como de microrganismos, pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação, ao contrário do metabolismo primário, que garante as substâncias (ácidos graxos, proteínas, carboidratos) responsáveis pelo crescimento e manutenção das células. Justamente por seu caráter não essencial, a habilidade em produzir estes compostos com variáveis estruturas químicas pode ser perdida. Calvo *et al.* (2002) e Okafor (2007) descrevem algumas hipóteses que tentam justificar a produção destas substâncias:

- de que são produtos das vias do metabolismo primário e da quebra das macromoléculas, servindo como um estoque de material nutritivo;
- que inibiriam a competição de outros microrganismos por nutrientes ou, para as plantas, impediriam a infecção por fitopatógenos;
- de que, por serem produzidos no esgotamento de um nutriente vital, manteriam os mecanismos essenciais para a multiplicação celular ativando outras vias para a sua produção, principalmente no que diz respeito à produção de enzimas;
- de que, no caso de uma super-produção de algum metabólito primário, este excesso seria convertido no metabólito secundário e excretado da célula evitando a morte celular;
- que serviriam como um mecanismo de detoxificação;
- de que regulariam algumas mudanças morfológicas, principalmente para os microrganismos, as quais estão comumente associadas à esporulação, ativando-a ou produzindo pigmentos para as suas estruturas;
- de que são formadas dentro de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, e que quando o resultado é um produto que favoreça a sobrevivência este mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência.

Este tipo de metabolismo ocorre teoricamente após a fase de crescimento celular, quando há exaustão de um nutriente, biossíntese ou adição de um indutor,

e/ou pelo decréscimo da taxa de crescimento. Ele é característico de algumas espécies de plantas e microrganismos (fungos, líquens e actinomicetos são os organismos com maior capacidade de produzi-los) e é regulado por determinados nutrientes, taxa de crescimento, *feedback*, indução e inativação enzimática, porém ainda há pouco conhecimento de suas vias em relação ao que se sabe sobre metabolismo primário (OKAFOR, 2007). A produção de um determinado metabólito, incluindo os secundários, principalmente em fungos e plantas é tão limitada a uma espécie que há estudos que buscam traçar um perfil químico dos metabólitos de cada uma delas em busca da classificação e identificação do isolado ou da planta. Tais estudos se enquadram em um dos conceitos de quimiotaxonomia (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

Os metabólitos secundários passaram a ser explorados pela sua importância nas áreas da saúde e da economia, já que se comportam como substâncias antibióticas, pigmentos, toxinas, ferormônios, enzimas inibidoras, agentes imunomoduladores, agonistas, antagonistas, pesticidas, antitumorais, promotores de crescimento de planta e animais (OKAFOR, 2007). Porém, nem todos são benéficos aos seres humanos. Um exemplo de produtos naturais deletérios são as micotoxinas (CALVO *et al.*, 2002). A maior fonte de metabólitos secundários bioativos são os fungos, que se destacam ecologicamente pelas suas interações químicas. Entre eles os mais estudados quimicamente estão: *Penicillium expansum* (patulina, citrinina, chaetoglobosinas, roquefortine, expansolides, communesinas, geosmina, e fumaryl-D,L-alanina - Andersen *et al.*¹; Frisvad *et al.*² citados por FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008), *Fusarium poae* (trichothecenes, culmorinas, aurofusarina, fusarinas, beauvericina, e enniatinas - Thrane *et al.*³ citados por FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008) e *Alternaria gaisen* (ácido tenuazonico, tentoxina, altertoxina A, alternarióis, toxina AK, e altersetina – Andersen *et al.*⁴ citados por FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

¹ ANDERSEN, B., SMEDSGAARD, J., FRISVAD, J.C. ***Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:2421–2429. 2004

²FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*.** A guide to identification of the food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology 49: 1–173. 2004.

³ THRANE, U., ADLER, A., CLASEN, P.E., GALVANO, F., LANGSETH, W., LOGRIECO, A., NIELSEN, K.F., RITIENI, A. **Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*.** International Journal of Food Microbiology 95: 257–266. 2004.

⁴ ANDERSEN, B., HANSEN, M.E., SMEDSGAARD, J. **Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp.** Phytopathology 95: 1021–1029. 2005.

2.3.1 Fermentação

Fermentação é o cultivo de um microrganismo que não permite contaminação e fornece as condições necessárias para a produção máxima do metabólito desejado, podendo ou não ser secundário (OKAFOR, 2007). De acordo com o mesmo autor, as fermentações podem ocorrer em meios líquidos ou sólidos, sendo que as que ocorrem em meio líquido são as mais utilizadas industrialmente. Ainda, quando a fermentação envolve fungos filamentosos ou actinomicetos é necessário que o meio de cultura seja agitado, pois isso ajuda na distribuição homogênea do oxigênio e dos nutrientes por todo o cultivo. O controle da temperatura e do pH, na qual há uma produtividade ótima do metabólito, também são fatores importantes que devem ser estabelecidos para a fermentação; esta variação na produção dos compostos, dependente tanto dos fatores ambientais quanto da genética do microrganismo, é aparentemente causada pela baixa especificidade das enzimas envolvidas com o metabolismo secundário, já que erros no metabolismo destas substâncias não seriam letais (MARTIN; DEMAÏN, 1980; OKAFOR, 2007).

2.4 Fitopatógenos

Vários microrganismos, fungos, bactérias, vírus, podem invadir as plantas, resistir aos seus mecanismos de defesa e acarretarem danos a elas, além de alterar o metabolismo primário e o secundário. Tais microrganismos são conhecidos como fitopatógenos (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007). As conseqüências da fitopatogênese quando em plantas utilizadas na alimentação, como árvores frutíferas, milho, trigo, soja entre outros, são de perda da produção e/ou perda econômica por depreciação.

Dentre os fitopatógenos destaca-se o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causador da Mancha Preta dos Citros (MPC), doença presente em pomares brasileiros caracterizada por lesões negras com bordas salientes e depressão central em frutos cítricos; a MPC é responsável pela queda prematura dos frutos e

conhecida por impossibilitar a exportação dos mesmos para países europeus (GOES; FEICHTENBERGER, 1993; TIMMER¹ citado por TIMMER; DUNCAN, 1999; AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002; GLIENKE *et al.*, 2002; STRINGARI *et al.*, 2009).

2.4.1 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 atualmente: a produção e extração de metabólitos secundários por endófitos, já que eles comprovadamente possuem a propriedade de inibir o crescimento de diversos microrganismos (LIU *et al.*, 2001), e o controle biológico. 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).

¹ TIMMER, L. W. **Diseases of fruit and foliage.**

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Correlacionar a atividade antimicrobiana das folhas de *Schinus terebentifolius* Raddi com os microrganismos endofíticos (fungos e actinomicetos) nela presentes.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto das folhas de *Schinus terebentifolius* Raddi e de suas frações, contra diferentes grupos de microrganismos e sua provável concentração inibitória mínima;
- Sugerir as classes de compostos químicos presentes nas frações ativas da planta;
- Realizar o isolamento dos endófitos das folhas de aroeira;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos diferentes isolados endofíticos (fungos e actinomicetos) obtidos das folhas de aroeira;
- Sugerir as classes de compostos químicos presentes nos metabólitos secundários ativos extraídos dos microrganismos;
- Identificar os microrganismos endofíticos isolados, em especial os com atividade antimicrobiana.

4 METODOLOGIAS

4.1 Meios de cultura

4.1.1 Caldo Müller-Hinton (CMH)

Infusão de carne bovina 30,0 g
Peptona de caseína ácida 17,5 g
Amido 1,5 g
Água destilada q.s.p. 1000,0 mL

4.1.2 Meio Ágar Extrato de Malte (MEA) (PATERSON; BRIDGE, 1994)

Extrato de malte 20,0 g
Glicose 20,0 g
Peptona 1,0 g
Ágar 15,0 g
Água destilada q.s.p. 1000,0 mL
pH 5,8

4.1.3 Meio Ágar Müller-Hinton (MHA)

Infusão de carne bovina 30,0 g
Peptona de caseína ácida 17,5 g
Amido 1,5 g
Ágar 17,0 g
Água destilada p/1000,0 mL

4.1.4 Meio Czapeck

Glicose 30,0g
NaNO₃ 2,0g
K₂HPO₄ 2,0g
MgSO₄.7H₂O 0,5g
KCl 0,5g
FeSO₄ 0,5g
Água destilada q.s.p. 1000,0mL
pH 8,5

4.1.5 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata descascada e cortada 200,0 g
Dextrose 20,0 g
Ágar 15,0 g
Água destilada p/1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos. Filtrou-se com gaze, adicionou-se a dextrose ao caldo e completou-se com água destilada em quantidade suficiente para 1000,0mL. O pH foi ajustado para 6,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Acrescentou-se o ágar.

4.1.6 Meio MPE

Glicose 20,0g
Extrato de soja 20,0g
NaCl 5,0g
CaCO₃ 2,0g
pH 6,7-7,0

4.1.7 Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC) (KÜSTER; WILLIAMS, 1964)

Amido (ou glicerol) 10,0g

Caseína 0,3g

KNO₃ 2,0g

NaCl 2,0g

K₂HPO₄ 2,0g

MgSO₄.7H₂O 0,05 g

FeSO₄.7H₂O 0,01g

Ágar 18,0g

Água destilada q.s.p. 1000,0mL

pH 7,0-7,2

Após a esterilização do meio, antes do plaqueamento, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, foram acrescentados 50µg/mL de ciclohexamida ao meio.

OBS: Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1atm e armazenados em temperatura ambiente ou em geladeira.

4.2 Soluções

4.2.1 Reativo de Dragendorff

Solução A: foram dissolvidos 1,7g de nitrato de bismuto e 20,0g de ácido tartárico em 80,0mL de água destilada.

Solução B: foram dissolvidos 16,0g de iodeto de potássio em 40,0mL de água destilada.

Solução de reserva: foram misturados volumes iguais da solução A com a solução B e mantidos em geladeira.

Solução pulverizadora: foram dissolvidos 10,0g de ácido tartárico em 50,0mL de água e adicionado 5,0mL da solução de reserva.

4.2.2 Solução de Anisaldeído

Foram dissolvidos 0,5mL de anisaldeído em 50,0mL de ácido acético glacial 96% e adicionado 1,0mL de ácido sulfúrico 95-97%.

4.2.3 Solução de Hidróxido de Potássio 5%

Foram dissolvidos 5,0g de hidróxido de potássio em 100,0mL de metanol.

4.2.4 Solução de Ninidrina

Foram dissolvidos 0,3g de ninidrina em 100,0mL de butanol e acrescentado 3,0mL de ácido acético glacial 96%.

4.2.5 Solução de Vanilina Sulfúrica Ácida (1% p/v)

Foi dissolvido 1,0g de vanilina em 100,0mL de ácido sulfúrico.

4.3 Exemplar botânico

As amostras de *Schinus terebentifolius* Raddi foram coletadas a partir de um exemplar da planta, de aproximadamente seis metros, presente no campus universitário da Universidade Federal do Paraná (Centro Politécnico, Jardim das Américas), mais precisamente, à latitude 25° 26.827S, longitude 49° 13.997O e altitude de 940m (GPS *Ashtech Promark 2*), de acordo com o Departamento de Geomática, Curso de Engenharia Cartográfica da UFPR.

A identificação botânica da planta foi realizada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR (UPCB) pelo **Prof. Dr. Olavo Araújo Guimarães**. O herbário possui uma exsicata da planta sob o registro: UPCB-30848.

4.4 Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e de suas frações obtidas a partir das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

4.4.1 Coleta do material botânico e obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Foram coletadas folhas jovens, aparentemente sadias (inteiras, sem manchas) da planta adulta. Essa coleta foi realizada no mês de maio de 2008.

As folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi, previamente secas em estufa com temperatura inferior a 40°C, foram trituradas, pesadas (123g) e colocadas em um *Erlenmeyer* contendo o dobro do volume ocupado pela folha de éter de petróleo. As folhas ficaram em contato com este solvente por três dias, depois o extrato foi filtrado com o auxílio de um funil simples e algodão e as folhas colocadas novamente em contato com o éter de petróleo pelo mesmo período de tempo. Após a retirada do filtrado contendo éter de petróleo as folhas foram expostas, do mesmo modo, ao metanol. Para o metanol foram realizadas três etapas de três dias de extração. Os extratos metanólicos foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo (HARBORNE, 1998).

4.4.2 Fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

O extrato bruto metanólico concentrado foi fracionado através de uma coluna de cromatografia à vácuo utilizando um gradiente de eluição com solventes e misturas de solventes na seguinte ordem: éter de petróleo, éter de petróleo:diclorometano 1:1, diclorometano, diclorometano:acetato de etila 1:1, acetato de etila, acetato de etila:metanol 1:1 e metanol. Para o fracionamento aproximadamente 2g do extrato metanólico bruto concentrado foram incorporados em 4g de sílica gel 60 (70-230 mesh). Esta mistura foi colocada sobre 43g da mesma sílica presente dentro de uma coluna de fracionamento a vácuo. Em

seguida, 250mL de cada solvente ou mistura de solventes foram vertidos separadamente sobre a camada de sílica em ordem de polaridade, do mais apolar para o mais polar; para o acetato de etila foram utilizados 350mL e para o diclorometano:acetato de etila (1:1) foram usados 450mL, porque este solvente e esta mistura de solventes, ao serem coletados após a passagem pelo extrato, apresentaram uma coloração mais intensa, dando indício de maior concentração de metabólitos. Cada fração foi recolhida separadamente em um balão de vidro e foi concentrada em evaporador rotativo (HARBORNE, 1998).

4.4.3 Ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e de suas frações

4.4.3.1 Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2003):

Em placas de Petri contendo 30 mL de ágar Müller-Hinton (item 4.1.3) foram feitos, em cada placa, quatro orifícios de 6mm de diâmetro, sendo um para o controle negativo (etanol 30%), um para o controle positivo (cloranfenicol 8,0mg/mL para bactérias e nistatina 100000UI/mL para leveduras), um como controle do solvente do extrato/frações (dimetilsulfóxido) e outro para o(a) extrato/fração a ser analisado(a). Feitos os orifícios, a superfície do meio de cultura teve o inóculo semeado com o auxílio de um *swab*. Nesta semeadura os inóculos apresentavam uma concentração de 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^6 UFC/mL para a levedura e foram originários de uma cultura prévia em meio MHA (item 4.1.3) de 24 horas. A concentração do inóculo foi ajustada com o auxílio de uma escala MacFarland 0,5. Os microrganismos utilizados para a realização do teste foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Em seguida, 50µL de extrato/fração e dos controles foram pipetados em seus respectivos poços.

As concentrações utilizadas para o extrato e frações das folhas de aroeira foram as máximas possíveis no volume a ser usado de acordo com a solubilidade do(as) extrato/frações.

Após o preenchimento dos poços as placas foram incubadas sem inverter, a 35°C, por 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Então, os resultados foram coletados através da medida do halo de inibição de crescimento formado em volta do poço. O experimento foi realizado em duplicata.

4.4.3.2 Método da macrodiluição (adaptação do manual padronizado pela CLSI M7-A6, 2003; Gold standart para a verificação de atividade antimicrobiana):

Em tubo de ensaio contendo 1mL de caldo Müller-Hinton (item 4.1.1), já adicionado com o extrato/fração em concentração conhecida, foi inoculado 1mL do microrganismo a ser combatido na concentração de 10^5 UFC/mL proveniente de uma cultura prévia em MHA (item 4.1.3.) de 24 horas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 27213, *Escherichia coli* - ATCC 35219, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 e *Candida albicans* - ATCC 10231). A concentração do microrganismo foi ajustada com o auxílio de uma escala MacFarland 0,5 seguida de diluição. Um controle de crescimento do inóculo foi preparado contendo 1mL de caldo Müller-Hinton (item 4.1.1) e 1mL do microrganismo na mesma concentração do ensaio. Para controlar a influência do solvente (dimetilsulfóxido) na atividade do(as) extrato/frações utilizado(as) foram preparados controles contendo o volume de solvente igual ao volume de extrato/fração utilizado(a). Estes controles seguiram o mesmo protocolo desta metodologia. Os tubos de ensaio foram incubados a 35°C por 18 horas, em seguida o padrão de turbidez, indicativo de multiplicação do microrganismo, foi analisado. Para uma análise mais exata dos resultados uma alíquota de 100µL de cada tubo de ensaio foi semeada, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton (item 4.1.3) e esta foi incubada a 35°C por 24 horas para posterior análise do crescimento por contagem das colônias. Para a levedura o período de incubação foi de 48 horas, também a 35°C. O teste foi realizado em duplicata. Foram realizadas variações de 100µg entre cada concentração do(as) extrato/frações para que fosse encontrada a concentração

inibitória mínima. Como controles positivos foram utilizados 40µL de cloranfenicol (8,0mg/mL) para as bactérias e 40µL de nistatina (100000UI/mL); os controles foram utilizados em volumes constantes apenas para a validação da técnica.

4.5 Isolamento de endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Alguns dos microrganismos endofíticos estudados foram obtidos a partir de um estudo prévio, da mesma árvore da qual foi coletada a amostra para obtenção do extrato e de novos microrganismos endofíticos, realizado por Lima (2008) e pertencente à coleção de cultura do LabGeM/UFPR.

Utilizando o mesmo protocolo do estudo anterior, descrito a seguir, foram realizados novos isolamentos, o primeiro em setembro de 2008 e o segundo em março de 2009, visando uma amostragem maior de microrganismos.

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos foi a descrita por Petrini¹ citado por Andrews e Hirano (1991), com algumas modificações. Foram coletadas folhas aparentemente saudáveis (sem manchas, cortes, rugas) com pecíolos, acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e levadas ao laboratório. Para desinfestação da superfície do material as folhas foram lavadas em água corrente abundante. Os pecíolos foram parafinados para evitar a entrada das soluções, utilizadas para a desinfecção da superfície das folhas, nos tecidos internos das folhas, desta forma preservando os endófitos a serem isolados. Em seguida, a fim de se eliminarem os microrganismos epifíticos, as folhas passaram por uma bateria de soluções, na qual primeiramente foram imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, depois em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 4 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos, e por último em água destilada esterilizada por 6 minutos.

As folhas foram cortadas, em condições de assepsia, em fragmentos de 0,5x0,5cm, utilizando um bisturi esterilizado, os quais foram transferidos para placas de Petri com diferentes meios de cultura (BDA, item 4.1.5, com tetraciclina - 50µg/mL- para fungos e ágar seletivo para actinomicetos). Então, as placas foram

¹ PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves.**

incubadas a 28°C por 20 dias, sendo o crescimento verificado diariamente para o repique dos microrganismos que se desenvolveram. Para o cálculo da frequência de isolamento foi usada uma relação de 100% para o número de fragmentos semeados.

Os endófitos 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.

4.6 Identificação dos microrganismos endofíticos isolados das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Todos os fungos filamentosos isolados tiveram suas características macroscópicas e microscópicas estudadas, sendo que, os dezenove fungos selecionados para a extração de metabólitos ativos foram priorizados realizando-se o cultivo em dois meios diferentes (BDA – item 4.1.5 e MEA – item 4.1.2) e o microcultivo em meio BDA (item 4.1.5). Os actinomicetos foram identificados por macroscopia, microscopia e coloração de Gram. Estas análises visaram uma caracterização de gênero e foram baseadas nas descrições de Larone (1993); Fischer e Cook (2001); Watanabe (2002); The University of Adelaide (2009).

Os fungos e actinomicetos que em algum dos ensaios com os seus extratos apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidos a extração de DNA e seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para os fungos e de parte da região 16S do rDNA para o actinomiceto buscando a identificação das espécies.

4.6.1 Extração de DNA

Os fungos filamentosos e o actinomiceto selecionados foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA (item 4.1.5) recoberto por uma camada de papel celofane previamente esterilizado. Foram, então, incubados a 28°C por três (isolados LGMF692, LGMF713 e LGMF625), quatro (isolados LGMF694, LGMF698, LGMF673

e LGMF627) ou cinco dias (isolados LGMF655 e LGMF696), dependendo da taxa de crescimento do microrganismo. Após, o papel celofane contendo em sua superfície o crescimento microbiano foi removido com o intuito de evitar ao máximo o contato com o meio de cultivo, para a raspagem das células. A massa celular foi liofilizada por aproximadamente 48 horas, em seguida, as células foram trituradas em Graal de porcelana com o auxílio de um pistilo e adição de nitrogênio líquido. Então, o macerado foi colocado em tubo do tipo *Eppendorf* de 2mL utilizado para a extração de DNA por uma das duas diferentes metodologias apresentadas abaixo.

Inicialmente foi utilizada a metodologia descrita por Waculicz-Andrade (2009). Foi adicionado a cada macerado celular 1500µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 - concentração final 125mMol/L; NaCl - concentração final 2 Mol/L; EDTA pH 8,0 - concentração final 50mMol/L; SDS pH 7,2 - concentração final 1%) mantida previamente a 65°C. O macerado contendo a solução de lise foi homogeneizado por 5 minutos horizontalmente em agitador de tubos e incubado por 40 minutos em banho de aquecimento a 55°C. As misturas foram agitadas por inversão com alguma periodicidade enquanto permaneciam no banho. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13000g e, então, 1000µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo *Eppendorf*, ao qual foi adicionado 1000µL de clorofil (clorofórmio/álccol isoamílico 24:1 v/v). Então, os tubos foram homogeneizados por 2 minutos horizontalmente em agitador de tubos e centrifugados por 15 minutos a 2050g. Em seguida foram transferidos 600µL do sobrenadante, cuidando para não pipetar a fase inferior, para um novo tubo *Eppendorf* e adicionado 900µL de acetato de potássio (CH₃COOK – 5Mol/L) esterilizado, para uma concentração final de 3M em cada tubo, agitou-se em agitador de tubos por 2 minutos. Uma nova etapa de centrifugação foi procedida por 30 minutos a 13000g e novamente 1000µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo *Eppendorf* com o cuidado de não perturbar o *pellet* formado. A este novo tubo foram acrescentados 1000µL de isopropanol gelado, agitado horizontalmente por 1 minuto em agitador de tubos e centrifugado a 12000g por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi vertida com cuidado para não derrubar o *pellet* de DNA, ao qual foram adicionados 1000µL de etanol 70% a -20°C seguido de agitação em homogeneizador de tubos por 10 segundos e centrifugação por 10 minutos a 12000g a 4°C. Então, a fase aquosa foi desprezada com cuidado para que o *pellet* de DNA não fosse perdido e a ele foram adicionados

500µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 5 minutos a 12000g a 4°C. Novamente a fase aquosa foi descartada com o mesmo cuidado, as bordas dos *Eppendorfs* foram secas com papel absorvente e os tubos foram deixados secando por 30 minutos em estufa a 30°C. Após secos, os DNAs foram ressuspensos em água ultrapura e permaneceram em repouso por pelo menos 1 hora antes de serem novamente manipulados.

Para as amostras LGMF692, LGMF713, LGMF625 foi utilizado um kit comercial da marca Qiagen® - *DNeasy® Plant Mini Kit* (Cat.No. 69104; 2006). Todas as etapas de extração foram seguidas de acordo com as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v em TBE1x), utilizando 5 µL do padrão de peso molecular (DNA do fago λ clivado com a enzima *Hind III - Invitrogen®*). Após a corrida de eletroforese o gel de agarose contendo *GelRed* foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado. Com o auxílio do programa *UVP Bio-Imaging Systems* (2003 *Labworks v4.6 Image Acquisition and analysis software*. Upland, EUA) o DNA foi quantificado e posteriormente, dependendo da necessidade, diluído com água ultrapura para uso na concentração de 10ng/µL.

4.6.2 Seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA para os fungos e de parte da região 16S do rDNA para o actinomiceto (STRINGARI, 2009; MONCIARDINI *et al.*, 2002):

Primeiramente foi realizada uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) V9G e ITS4 (QUADRO 1), universais para fungos, que amplificam a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e os *primers* Sm6F e Sm5R (QUADRO 1), específicos para a família *Streptomycetaceae*, que amplificam a região 16S do rDNA, seguindo as condições descritas a seguir.

Primer	Seqüência	Referência
V9G	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	De Hoog e Gerrits Van Den Ende (1998)
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White e Morrow (1990)
Sm6F	5' GGTGGCGAAGGCGGA 3'	Monciardini <i>et al.</i> (2002)
Sm5R	5' GAACTGAGACCGGCTTTTTGA 3'	Monciardini <i>et al.</i> (2002)

QUADRO 1 – SEQÜÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA O SEQÜENCIAMENTO DOS ENDÓFITOS DAS FOLHAS DE AROEIRA PRODUTORES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A amplificação para as amostras fúngicas seguiu as condições descritas por Stringari (2009) contendo: 50ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06µM de *primers* (3pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂ em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 3 minutos a 72°C.

A amplificação para a amostra de actinomiceto seguiu as condições descritas por Monciardini *et al.* (2002) contendo: 50ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,5µM de *primers* (25pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂ em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 65°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v em TBE1x) utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (100pb *Ludwing Biotec*).

Para a **purificação dos produtos de PCR** foram acrescentados 50µL de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após este período os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13800g. Então, o sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125µL de etanol 80% gelado permanecendo em contato por 1 minuto antes de nova centrifugação a 13800g por 2 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e ao restante adicionado 125µL de etanol absoluto pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado resultando em um *pellet*, que foi ressuscitado em 15µL de água ultrapura permanecendo em repouso a temperatura ambiente por pelo menos duas

horas. Após a purificação, os produtos foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v em TBE 1x) utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (100pb *Ludwing Biotec*).

O **seqüenciamento das regiões de rDNA** foi realizado pelo método de terminação da cadeia segundo Sanger, Nicklen e Coulson (1977) utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes em Sequenciador Automático de DNA *MegaBACE*.

As reações de seqüenciamento foram realizadas em placas envolvidas em papel alumínio com pouca luz incidente. Para cada reação foram utilizados 50-100ng do produto de PCR, sendo o volume a ser utilizado calculado de acordo com a quantificação realizada após a purificação do DNA amplificado. Foram utilizados também 0,4 μ M de *primer*, um volume de 2 μ L da mistura para seqüenciamento ET (kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da *Amersham Biosciences*[®]) e água ultrapura para completar o volume final de 10 μ L.

A amplificação para as amostras fúngicas foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 15 segundos a 50°C, e 1 minuto a 60°C.

Para a **purificação da reação de seqüenciamento** a cada produto da reação anterior foi adicionado 1 μ L de acetato de amônio 7,5M e 27,5 μ L de etanol absoluto. Após, a placa de seqüenciamento foi fechada e o conteúdo homogeneizado por inversão por 30 vezes. A placa foi então centrifugada por 45 minutos a 2500g e o sobrenadante descartado. Após um *spin down* (placa invertida sobre um papel toalha) a 500g foram adicionados 100 μ L de etanol 70% recém preparado. Seguiu-se uma centrifugação a 2500g com a placa aberta, e o sobrenadante foi descartado novamente e um *spin down* a 750g foi aplicado. Após, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo *MegaBACE* (*Amersham Biosciences*[®]).

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o seqüenciamento foram: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 70 segundos, voltagem da corrida de 6kV e tempo de corrida de 100 minutos.

As corridas efetuadas foram analisadas através de programas disponíveis no pacote de *softwares* do *MegaBACE*. O *Sequence Analyzer* gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa *ScoreCard* foram obtidas

as informações estatísticas de cada seqüência, como número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

A **edição das seqüências** obtidas foi realizada com o auxílio do programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2006) e posterior inspeção visual através do programa BioEdit versão 7.0 (HALL, 2005). As seqüências obtidas foram alinhadas pelo programa MAFFT versão 6 (*Multiple alignment program for nucleotide sequences*) e foram comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) permitindo a detecção de similaridade de uma seqüência biológica com seqüências caracterizadas já existentes. Para a análise das seqüências obtidas neste trabalho foi utilizado o programa BLASTn que compara as seqüências de nucleotídeos com um banco de dados de seqüências de nucleotídeos.

4.7 Atividade antimicrobiana dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

4.7.1 Seleção dos microrganismos endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi para a extração dos metabólitos secundários

Primeiramente foi realizada uma **seleção macromorfológica**, na qual apenas um exemplar de cada morfologia de colônia foi mantido para os ensaios posteriores.

Em seguida foi realizado um **ensaio de pareamento** dos microrganismos previamente selecionados pela macromorfologia **contra o fitopatógeno *Guignardia citricarpa* (cód. LGMF6** - pertencente à coleção de cultura do LabGeM/UFPR). Todos os microrganismos utilizados no ensaio foram semeados em placas de Petri contendo o meio BDA (item 4.1.5) e incubados por sete a quatorze dias, dependendo da taxa de crescimento, a 28°C. Após incubação discos de 10mm dos endófitos foram recortados com o auxílio de um vazador de rolhas. Estes discos de tamanho padronizado foram dispostos em placas de Petri contendo BDA (item 4.1.5) da seguinte maneira: um disco de *G. citricarpa* no centro da placa, e em cada lado, a

1cm da borda da placa e aproximadamente 3cm distante do fitopatógeno, dois discos do endófito, o qual a atividade contra *G. citricarpa* estava sendo testada. Para cada endófito a ser testado foram feitas cinco repetições do ensaio. Também foram feitas cinco placas como controle do crescimento de *G. citricarpa*. Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C e analisadas através da medida do diâmetro do fitopatógeno *G. citricarpa* em dois pontos da colônia, desprezando-se o tamanho inicial do inóculo. As medidas foram realizadas no sétimo e no décimo quarto dia de incubação. Após a coleta dos dados foram realizados os cálculos da percentagem de inibição para as duas datas (CORREA, 2008). Para avaliar se houve o controle do crescimento do fitopatógeno pelo endófito nos testes, a percentagem de inibição foi calculada com a seguinte fórmula:

$$PI\% = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Onde, Dc = diâmetro da colônia do controle de crescimento de *G.citricarpa*

Dt = diâmetro da colônia de *Guignardia citricarpa* exposta ao endófito.

A partir deste ensaio foram selecionados para fermentação apenas os microrganismos endofíticos que inibiram mais de 50% o crescimento de *Guignardia citricarpa* sem apresentar crescimento sobre o fitopatógeno.

Ainda para selecionar os fungos e actinomicetos endofíticos das folhas de aroeira de interesse para a obtenção de metabólitos secundários foi aplicada uma metodologia com objetivo de observar a **atividade destes microrganismos contra procariotos e leveduras**. Para isso, os endófitos foram incubados em BDA (item 4.1.5) por sete a quatorze dias, dependendo da taxa de crescimento do microrganismo, a 28°C. Com o auxílio de um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de ágar com o crescimento de 6 mm de diâmetro das bordas das colônias. Os cilindros foram transferidos para placas de Petri contendo uma camada de 15 mL de Ágar Müeller-Hinton (item 4.1.3). Cada placa recebeu cinco fragmentos, sendo um o controle negativo composto apenas de BDA (item 4.1.5) e quatro fragmentos de diferentes endófitos. Após a distribuição destes fragmentos na placa os mesmos foram envolvidos vertendo-se uma camada de Ágar Müeller-Hinton (item 4.1.3) fundido contendo o inóculo. Para o preparo do meio com o inóculo foi feita uma suspensão bacteriana, na concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL (escala

MacFarland n^o5), ou uma suspensão leveduriforme, com aproximadamente 10⁶ UFC/mL (escala MacFarland n^o5), em caldo Müeller-Hinton (item 4.1.1) a partir de uma cultura de 24 horas do microrganismo. Então, 100µL de uma destas suspensões foi adicionado em 15mL de Ágar Müeller Hinton (item 4.1.3) fundido em uma temperatura próxima aos 45°C, homogeneizado em Vortex[®].

As placas, contendo os cilindros dos endófitos e o meio com inóculo já solidificado, foram incubadas a 35°C por 24 a 48 horas, para bactérias e levedura respectivamente. Para a análise dos resultados foi investigada a presença de halos de inibição do crescimento bacteriano ou leveduriforme. Como controles da viabilidade do inóculo foram utilizadas placas apenas com a linhagem referência, sem os cilindros (MARIANO, 1993). Para este ensaio foram utilizadas as mesmas linhagens ATCC de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* dos ensaios anteriores.

4.7.2 Obtenção de metabólitos secundários a partir dos endófitos isolados das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Após crescimento em meio BDA (item 4.1.5) em placa de Petri por sete a quatorze dias a 28°C, foram retirados fragmentos do endófito com 10mm de diâmetro e semeados em *Erlenmeyers* com 50mL e 100mL dos meios líquidos Czapeck (item 4.1.4) e MPE (item 4.1.6), os quais foram incubados a 28°C, a 120 rpm. Os cultivos de 50mL foram incubados por 24 horas, enquanto os que estavam com 100mL de meio foram cultivados por sete dias. Após o período pré-determinado o micélio foi separado do meio metabólico por filtração à vácuo com papel filtro, e guardado. Ao volume do filtrado obtido foram adicionados 50mL de acetato de etila agitando vigorosamente por três vezes para a formação de duas fases: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. A fase orgânica foi separada em um novo recipiente para submeter a fase aquosa a mais uma extração com acetato de etila. O líquido orgânico obtido foi rotaevaporado, em temperatura inferior a 50°C, para a concentração dos metabólitos. Após seco e pesado o precipitado foi ressuscitado em metanol a uma concentração de 10mg/mL para ser testado quanto à atividade antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2004). A massa celular resultante da filtração a vácuo também teve seus metabólitos secundários extraídos através de

sua maceração com 30mL de acetato de etila seguida de filtração simples com auxílio de funil e algodão esterilizados; o extrato também foi reduzido, seco e ressuspendido como descrito anteriormente.

4.7.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos isolados das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

4.7.3.1 Avaliação dos compostos extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos endófitos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários obtidos a partir do meio de cultivo dos endófitos foi utilizada a metodologia de **bioautografia** em cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método ágar *overlay* (RAHALISON *et al.*, 1991; CORRADO; RODRIGUES, 2004).

Para realização da metodologia, primeiramente foi necessário reativar os microrganismos patogênicos a serem testados. As linhagens patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213) e *Candida albicans* (ATCC 10231)) foram inoculadas em 10mL de caldo Müller-Hinton (item 4.1.1), homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos e incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação os patógenos foram plaqueados em Ágar Müller-Hinton (item 4.1.3) 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 foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10mL de caldo Müller-Hinton (item 4.1.1), agitado em agitador de tubos e incubado a 35°C por 48 horas.

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 divididos em 16 quadrados de 1,5cm cada. Um pequeno corte no canto da placa de CCD foi feita para servir de guia. Os extratos solubilizados em metanol na concentração de

10mg/mL foram aplicados em duplicata nos volumes de 5 e 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 a realização dos testes uma alíquota de 100µL do inóculo, preparado como descrito anteriormente, foi transferido para um tubo contendo 15mL de ágar Müller-Hinton (item 4.1.3) fundido, mantido em temperatura próxima aos 45°C, evitando a solidificação momentânea, mas permitindo que o microrganismo fosse 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. Esperou-se o meio solidificar para que a placa de Petri fosse tampada e incubada a 35°C por 24 horas.

Após o período de incubação, para a melhor visualização dos resultados, as placas de CCD contendo o meio com inóculo sobreposto foram totalmente borrifadas com solução aquosa de MTT (2,5mg/mL) e incubadas por 1-2 horas para posterior leitura. A atividade foi detectada através da formação de halo de inibição contra um fundo roxo.

O teste da atividade dos **líquidos metabólitos** obtidos a partir da extração com acetato de etila do meio fermentativo dos endófitos **contra o fungo *Guignardia citricarpa*** foi realizado da seguinte maneira: alíquotas de 100µL dos extratos foram adicionadas na superfície do meio BDA (item 4.1.5), presente em placas de Petri descartáveis de tamanho 60X15mm, cobrindo todo o meio com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Após um período de aproximadamente 18h, necessário para a adsorção do extrato no meio, um disco de micélio de *G. citricarpa* com 6mm de diâmetro, proveniente de uma cultura prévia do microrganismo de sete a quatorze dias a 28°C, foi posicionado no centro da placa. O controle negativo foi realizado do mesmo modo com água destilada. Como controle positivo utilizou-se glifosinato (10mg/mL) e o controle do solvente do líquido metabólito foi realizado com metanol. As placas foram incubadas a 28°C durante 14 dias. A análise dos resultados foi realizada aos 7 e 14 dias de incubação de maneira idêntica a realizada para verificação dos resultados de pareamento (ver item 4.7.1). O ensaio foi feito em cinco repetições (FIALHO, 2004). Para este ensaio foram utilizados apenas os líquidos metabólitos dos endófitos que apresentaram mais de 75% de inibição contra

G. citricarpa no ensaio de pareamento. O extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi também foi avaliado neste mesmo ensaio.

4.7.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Para esta análise foi utilizada a metodologia dos poços já descrita no item 4.4.3.1 deste trabalho. Os microrganismos utilizados nesta etapa foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Como controles positivos foram utilizados: cloranfenicol 1mg/mL para *S. aureus* e 10mg/mL para *P. aeruginosa*, e nistatina 100000UI/mL para *C. albicans*. O metanol foi utilizado como controle do solvente do líquido metabólito e a solução fisiológica como controle negativo. Os compostos extraídos dos micélios e das células de actinomicetos foram, após secagem, ressuspensos em metanol em uma concentração de 10mg/mL. Cada poço foi preenchido com 50µL de cada solução. Após o preenchimento dos poços as placas foram incubadas sem inverter a 35°C por 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Então, os resultados foram coletados através da medida do halo de inibição de crescimento formado em volta do poço. O experimento foi realizado em duplicata. Foram analisados apenas os extratos com um rendimento maior ou igual a 3mg.

4.7.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo dos endófitos após a extração com acetato de etila

Para esta análise também foi utilizada a metodologia dos poços já descrita no item 4.4.3.1 deste trabalho. Os microrganismos e os controles utilizados foram idênticos aos do item anterior (4.7.3.2). Cada poço foi preenchido com 50µL do meio de crescimento do fungo/actinomiceto após a retirada da fração extraída com

acetato de etila. Todo o procedimento posterior foi exatamente igual ao descrito no item 4.7.3.2.

4.8 Comparação química entre os compostos ativos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi com os compostos ativos dos endófitos

Os metabólitos secundários com potencial antimicrobiano obtidos dos fungos e do actinomiceto endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi foram comparados com os compostos presentes no extrato bruto metanólico das folhas da mesma planta e em suas frações ativas por cromatografia em camada delgada. Esta metodologia permite a sugestão da presença de classes de compostos.

A cromatografia em camada delgada foi realizada aplicando-se a uma distância de aproximadamente 1cm da base de uma placa de sílicagel 60F₂₅₄ (Merck®), com auxílio de um capilar de vidro, os(as) extratos/frações selecionados(as) ressuspensos em metanol com um espaçamento de 1cm entre cada um. Desta maneira foram preparadas seis placas iguais com todos os(as) extratos/frações de interesse. Após esta primeira etapa, as placas foram colocadas em uma cuba de vidro com acetato de etila:metanol (1:1) para a eluição dos compostos. Quando o solvente se aproximava da borda superior da placa a mesma era retirada da cuba para secagem após ser marcada a altura em que o solvente eluiu. Depois de secas, cada placa foi analisada em luz ultravioleta de comprimento de onda curto e longo, borrifada com um revelador e analisada com ou sem aquecimento ou incidência de luz ultravioleta dependendo do revelador utilizado (MERK, 1972; WATSON, 1999; GONZALES; LECHUGA; SERRANO, 2001; ORDÓÑEZ; VEJA; MELAGÓN, 2006; RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009). Os reveladores utilizados foram:

- DRG (reativo de Dragendorff) para alcalóides (coloração amarela-laranja);
- KOH (hidróxido de potássio) para antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) – análise a olho nu e com luz ultravioleta de comprimento de onda de 365nm;

- VAS (vanilina sulfúrica ácida) para terpenóides (amarelo-marron) e ácidos graxos (azul) - análise após aquecimento;
- FeCl_3 (cloreto férrico, 1,5%) para compostos fenólicos (verde, púrpura, azul ou preto);
- Anisaldeído para uma revelação universal dos compostos presentes na amostra;
- Ninidrina para compostos nitrogenados, sendo aminas primárias rosadas e aminas terciárias amareladas – análise após aquecimento.

Os resultados foram analisados de acordo com a coloração que os compostos apresentavam frente aos reveladores para a distinção das classes de compostos isolados da planta e dos endófitos.

4.9 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância – ANOVA - com um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições. As análises foram realizadas em todas as etapas necessárias do trabalho. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao teste F, completou-se a análise com teste de Tukey para comparação das médias utilizando software ASSISTAT (FRANCISCO; SILVA, 2009).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e de suas frações

5.1.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

A partir das folhas de *S. terebenthifolius* foram obtidos 29,901g de extrato bruto metanólico concentrado, o que significa um rendimento de 24,31% em relação ao peso seco das folhas utilizadas.

O peso das frações concentradas e secas, assim como seus rendimentos, estão descritos na TABELA 1. A fração que apresentou o maior rendimento foi a de acetato de etila:metanol (1:1).

TABELA 1 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
Éter de petróleo	0,005	0,25
Éter de petróleo: diclorometano (1:1)	0,023	1,15
Diclorometano	0,079	3,95
Diclorometano: acetato de etila (1:1)	0,158	7,9
Acetato de etila	0,089	4,45
Acetato de etila:metanol (1:1)	1,349	67,45
Metanol	0,097	4,85

FONTE: O autor (2008)

5.1.2 Ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e de suas frações

A atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações foi avaliada por dois diferentes métodos, o método dos poços e o método da macrodiluição, conforme descrição a seguir.

5.1.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações pelo método dos poços

De acordo com os resultados obtidos com a metodologia dos poços sugere-se que o extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi possui compostos ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, conforme a TABELA 2. As frações deste extrato que apresentaram atividade antimicrobiana foram a de diclorometano:acetato de etila (1:1) e a de acetato de etila, sendo que a primeira teve um maior espectro de ação, atuando contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, enquanto a fração de acetato de etila só apresentou atividade contra *C. albicans*.

TABELA 2 – DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE QUATRO PATÓGENOS NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO DE *Schinus terebenthifolius* Raddi E DE SUAS FRAÇÕES AVALIADOS PELO MÉTODO DOS POÇOS

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato metanólico bruto (300mg/mL)	13mm	9mm e 10mm	19mm	20mm e 22mm
Fração éter de petróleo (2,5mg/mL)	X	X	X	X
Fração éter de petróleo:diclorometano (1:1) (10mg/mL)	X	X	X	X
Fração diclorometano (10mg/mL)	X	X	X	X
Fração diclorometano: acetato de etila (1:1) (20mg/mL)	10mm e 13mm	12mm e 14mm	X	17mm e 20mm
Fração acetato de etila (20mg/mL)	X	X	X	17mm e 20mm
Fração acetato de etila: metanol (1:1) (20mg/mL)	X	X	X	X
Fração metanol (20mg/mL)	X	X	X	X
Controle positivo (cloranfenicol 8mg/mL) (nistatina 100000UI/mL)	30mm	12mm	18mm	21mm

FONTE: O autor (2008)

NOTA: X = ausência de halo de inibição

OBS: como este ensaio só foi realizado para uma avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas de aroeira e suas frações não houve a preocupação em manter a concentração dos mesmos iguais para uma possível comparação dos resultados, já que a diferença de atividade entre os extratos e frações estudadas será analisada através da metodologia de macrodiluição. Na metodologia dos poços foi utilizada a maior concentração possível do/a extrato/fração.

5.1.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira e suas frações pelo método da macrodiluição

A análise dos resultados da macrodiluição demonstra que o extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi possui atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados (TABELA 3). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) observadas foram de 2300µg/mL para o *S. aureus*, 3000µg/mL para a *E. coli*, maior que 3600µg/mL para a *P. aeruginosa*, porém com redução no número de colônias, e 2000µg/mL para a *C. albicans*. Novamente as frações diclorometano:acetato de etila (1:1) e acetato de etila foram as que apresentaram atividade, porém nesta metodologia foi possível observar um maior espectro de ação das mesmas em comparação a metodologia dos poços. A fração diclorometano:acetato de etila (1:1) apresentou as seguintes CIMs: 500µg/mL para *S. aureus*, 1000µg/mL para *E. coli*, 1700µg/mL para *P. aeruginosa* e maior que 2300µg/mL para *C. albicans*, mas com redução no número de colônias. Para a fração acetato de etila as seguintes CIMs foram observadas: 1000µg/mL para *S. aureus*, 1300µg/mL para *E. coli*, 2200µg/mL para *P. aeruginosa* e maior que 2300µg/mL para *C. albicans*, mas com redução no número de colônias. Estes resultados podem ser visualizados na TABELA 3.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *Schinus terebenthifolius* Raddi E DE SUAS FRAÇÕES PELO MÉTODO DA MACRODILUIÇÃO

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato metanólico bruto	ATIVO CIM* = 2300 µg/MI	ATIVO CIM = 3000 µg/MI	ATIVO CIM >3600 µg/mL +-200col.	ATIVO CIM = 2000 µg/mL
Fração éter de petróleo	X	X	X	X
Fração éter de petróleo:diclorometano (1:1)	X	X	X	X
Fração diclorometano	X	X	X	X
Fração diclorometano: acetato de etila (1:1)	ATIVO CIM = 500µg/mL	ATIVO CIM = 1000µg/mL	ATIVO CIM = 1700 µg/mL	ATIVO CIM >2300 µg/mL +-15col.
Fração acetato de etila	ATIVO CIM = 1000 µg/mL	ATIVO CIM = 1300 µg/mL	ATIVO CIM = 2200 µg/mL	ATIVO CIM >2300 µg/mL +- 90col.
Fração acetato de etila: metanol (1:1)	X	X	X	X
Fração metanol	X	X	X	X

FONTE: O autor (2008)

NOTA: * CIM = concentração inibitória mínima

X = ausência de atividade antimicrobiana

Como foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido para a ressuspensão do(as) extrato/frações houve a necessidade de verificar a influência do mesmo nos resultados devido a sua toxicidade. Para isso foi realizada pela metodologia da macrodiluição uma bateria de ensaios controle com variação no volume do solvente. A partir dos resultados observou-se que os volumes de extrato/frações a serem testados não poderiam ser superiores a 250µL.

5.2 Isolamento dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Dos fungos filamentosos isolados por Lima (2008), e pertencentes à coleção de cultura do LabGeM, 80 foram recuperados. Os isolamentos realizados no presente trabalho (setembro de 2008 e março de 2009) forneceram mais 48 fungos filamentosos e 3 actinomicetos, totalizando 128 fungos e três actinomicetos.

5.3 Identificação dos microrganismos endofíticos isolados das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

A partir das análises macroscópicas e microscópicas foram identificados os gêneros fúngicos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Penicillium*. Dentre estes destaca-se a presença de um grande número de isolados do gênero *Alternaria*. A FIGURA 7 ilustra algumas estruturas de reprodução que auxiliaram na identificação destes gêneros.

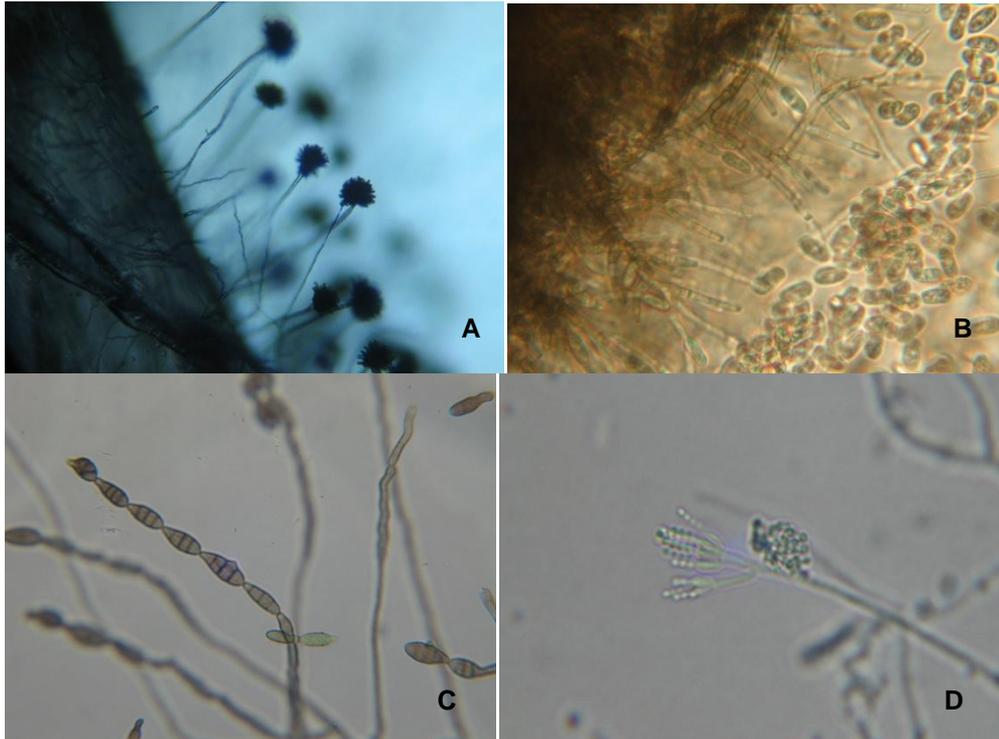


FIGURA 7: ESPOROS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DE QUATRO FUNGOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi

A – *Aspergillus* sp. (aumento 400X; coloração – azul de lactofenol)

B – *Colletotrichum* sp. (aumento 400X)

C – *Alternaria* sp. (aumento 400X)

D – *Penicillium* sp. (aumento 400X)

FONTE: O autor (2009)

A FIGURA 8 ilustra a macromorfologia dos fungos (verso e reverso) selecionados para a extração dos metabólitos ativos em dois meios de cultivo, BDA (item 4.1.5) e MEA (item 4.1.2), incubados a 28°C por sete dias. Os fungos que apresentaram atividade antimicrobiana com algum dos extratos testados estão destacados em vermelho.

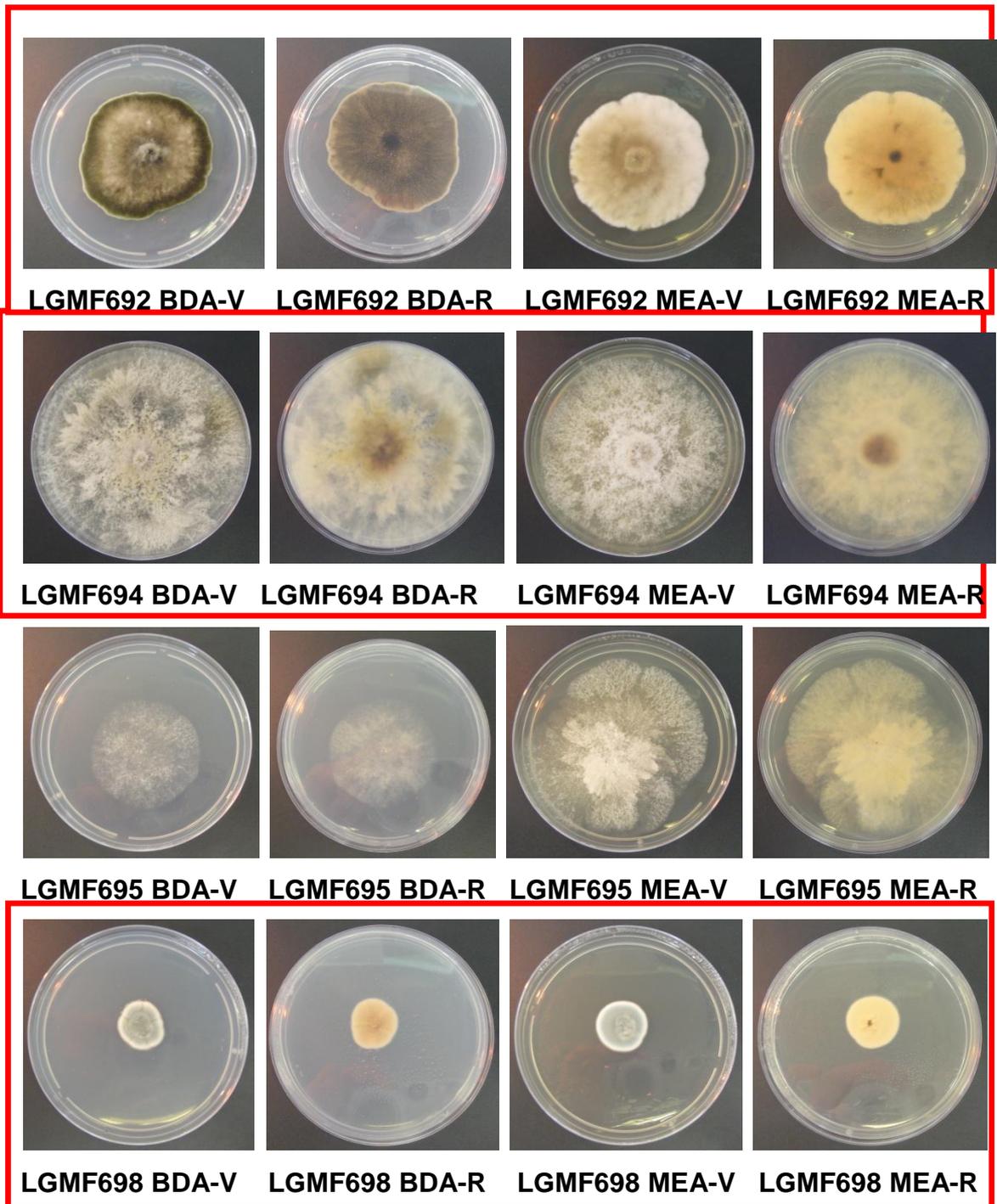


FIGURA 8 – MACROMORFOLOGIA EM MEIOS BDA E MEA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (**continua**)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: os quadrantes vermelhos indicam aqueles fungos que tiveram extraídos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana

V = verso das placas

R = reverso das placas

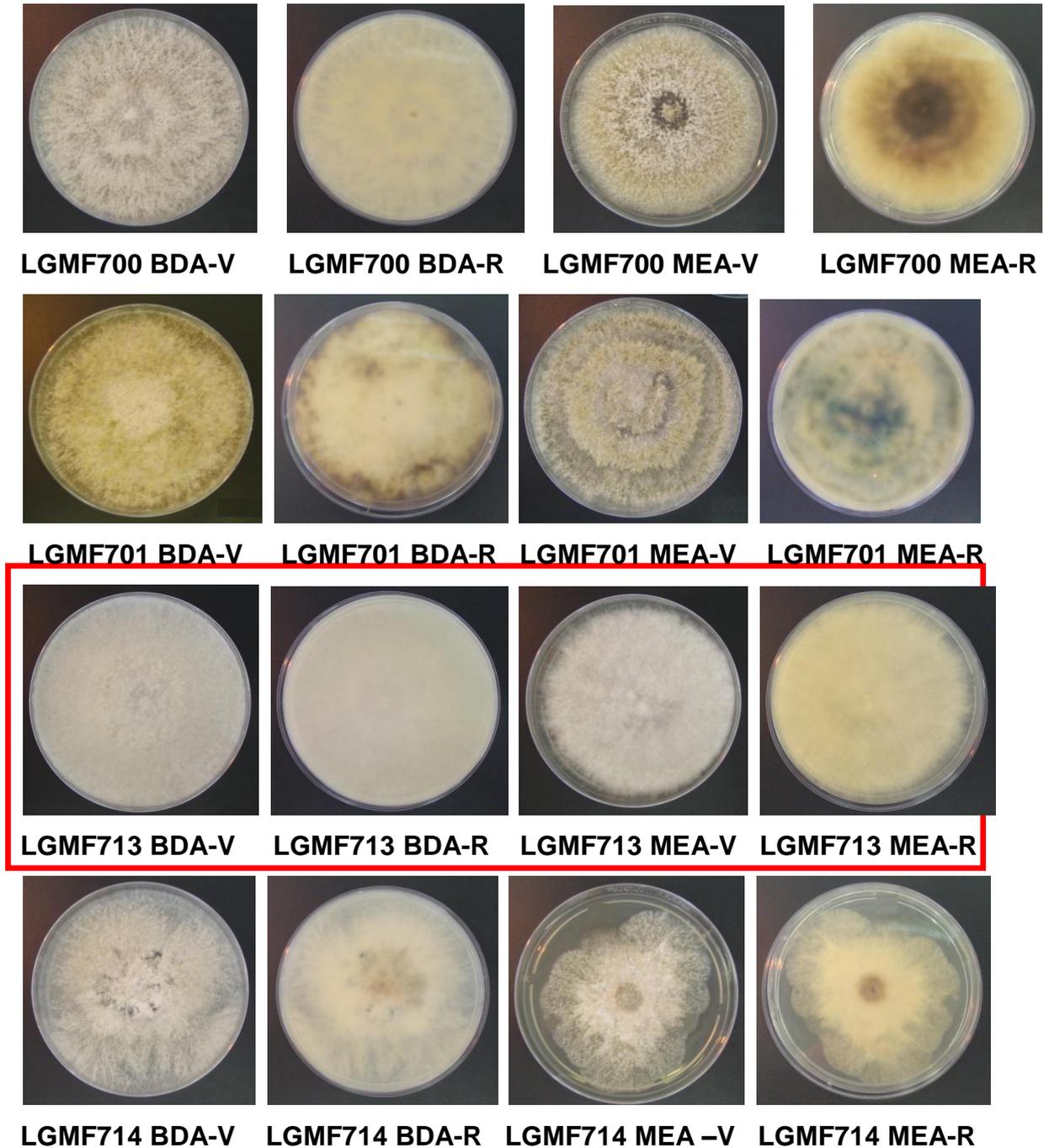


FIGURA 8 – MACROMORFOLOGIA EM MEIOS BDA E MEA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (**continuação**)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: os quadrantes vermelhos indicam aqueles fungos que tiveram extraídos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana

V = verso das placas

R = reverso das placas

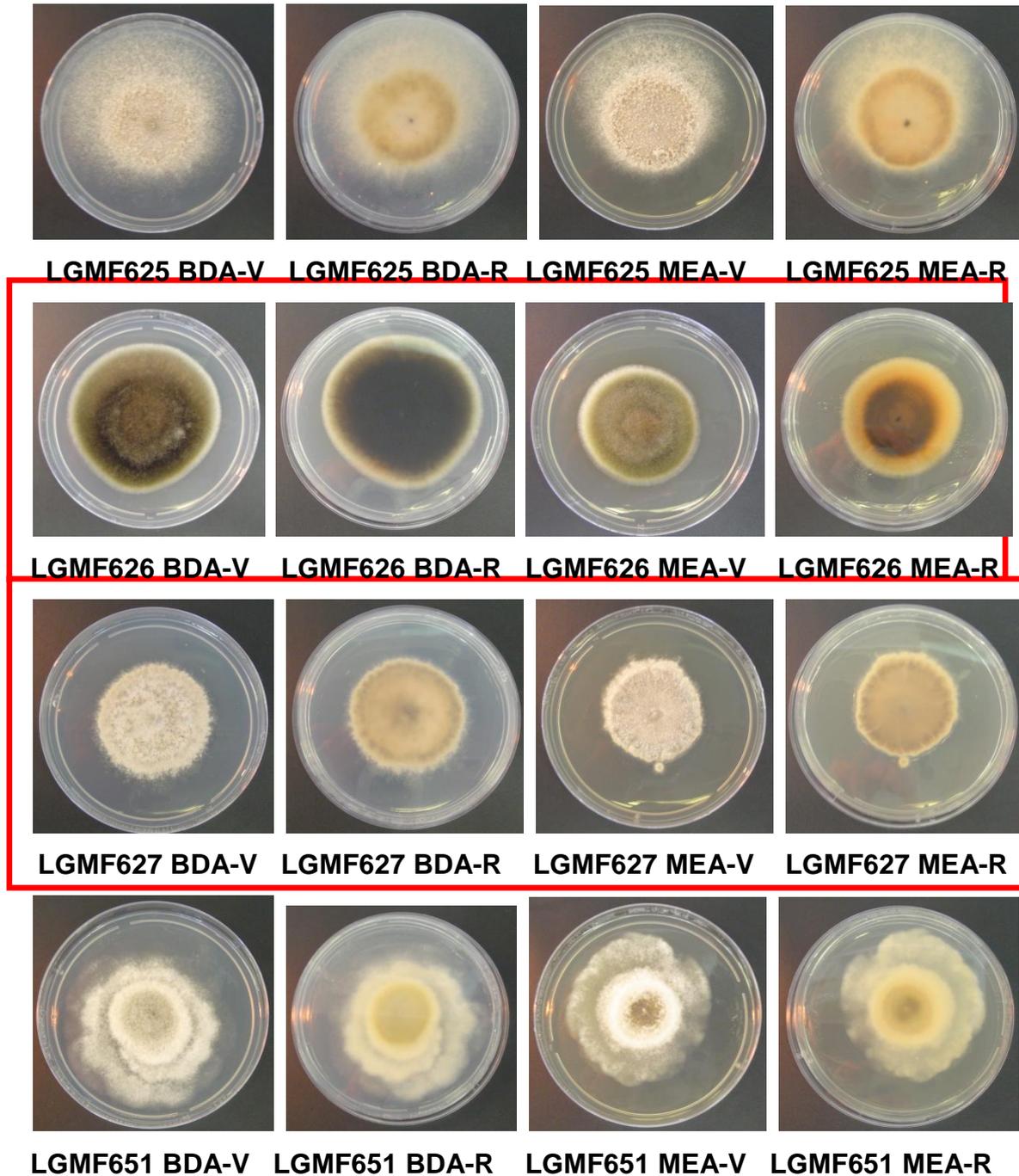


FIGURA 8 – MACROMORFOLOGIA EM MEIOS BDA E MEA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (continuação)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: os quadrantes vermelhos indicam aqueles fungos que tiveram extraídos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana

V = verso das placas

R = reverso das placas

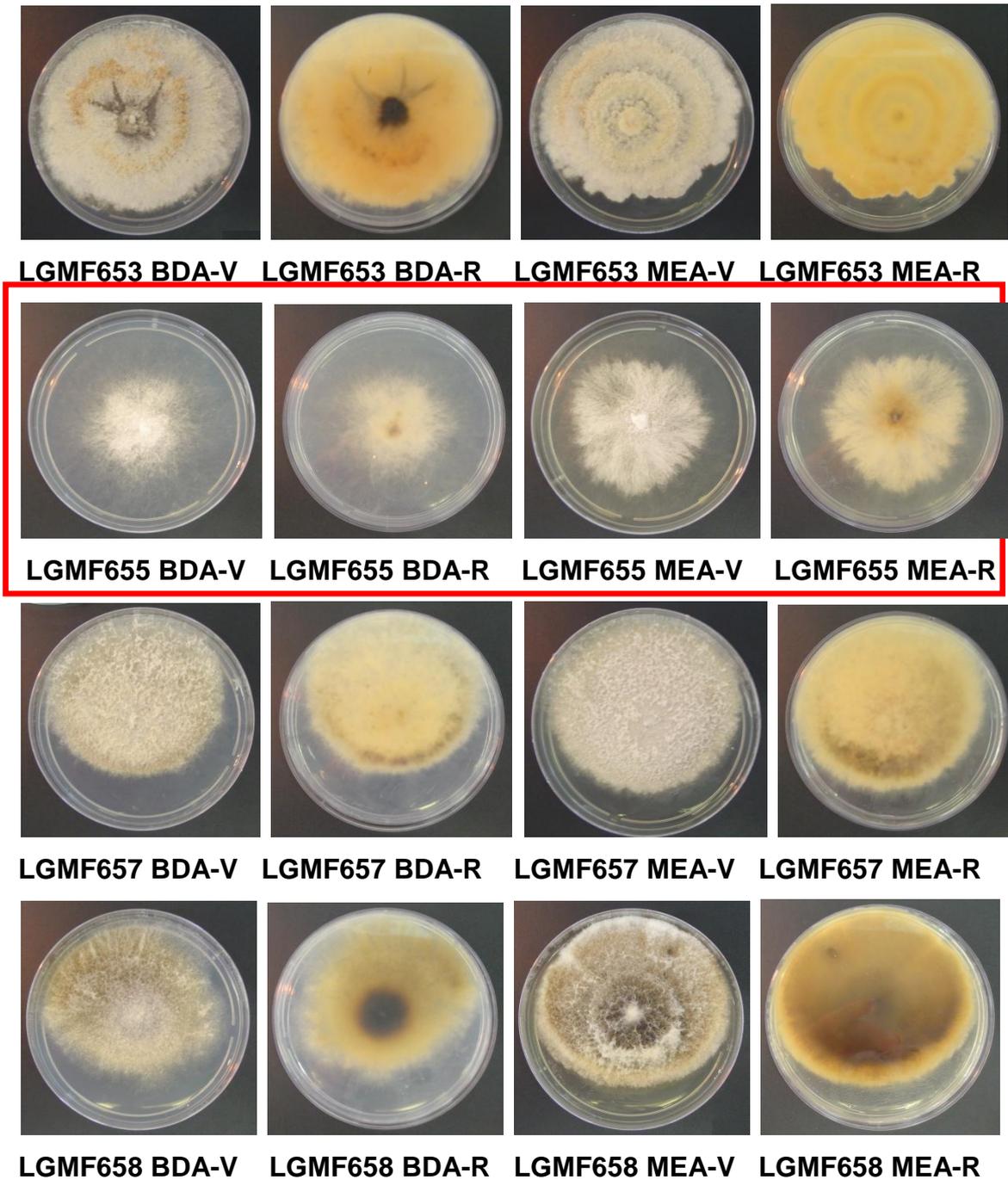


FIGURA 8 – MACROMORFOLOGIA EM MEIOS BDA E MEA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (**continuação**)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: os quadrantes vermelhos indicam aqueles fungos que tiveram extraídos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana

V = verso das placas

R = reverso das placas

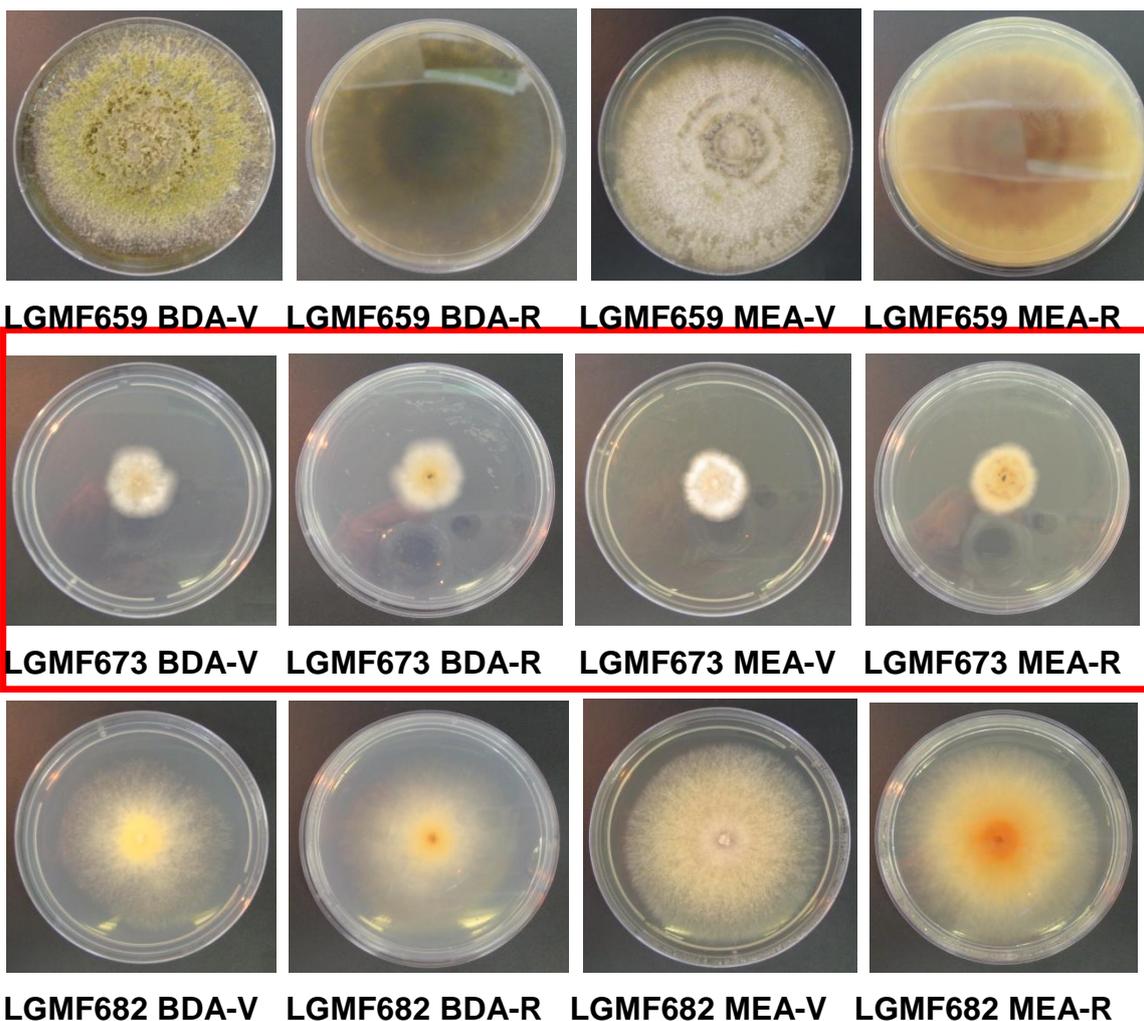


FIGURA 8 – MACROMORFOLOGIA EM MEIOS BDA E MEA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi (**conclusão**)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: os quadrantes vermelhos indicam aqueles fungos que tiveram extraídos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana

V = verso das placas

R = reverso das placas

As seqüências nucleotídicas obtidas da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos fungos endofíticos dos quais foram extraídos metabólitos ativos foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI resultando nas seguintes identificações:

- o fungo de código LGMF692 apresentou uma seqüência de 584pb com 100% de similaridade com o gênero *Alternaria*;

- o fungo de código LGMF694 apresentou uma seqüência de 360pb com 99% de similaridade com o gênero *Phomopsis*;

- o fungo de código LGMF698 apresentou uma seqüência de 525pb com 98% de similaridade com o fungo *Penicillium roseopurpureum*;
- o fungo de código LGMF713 apresentou uma seqüência de 552pb que o caracterizou como sendo um basidiomiceto, possivelmente (93% de similaridade) do gênero *Trichaptum*;
- o fungo de código LGMF626 apresentou uma seqüência de 608pb com 100% de similaridade com o gênero *Alternaria*;
- o fungo de código LGMF627 apresentou uma seqüência de 456pb com 97% de similaridade com o gênero *Phomopsis*;
- o fungo de código LGMF655 apresentou uma seqüência de 525pb com 98% de similaridade com o gênero *Phomopsis*.

O isolado actinomiceto que produziu extratos antimicrobianos, foi identificado por análise macro e micromorfológica como um indivíduo pertencente à família *Streptomycetaceae* (FIGURA 9). Portanto, utilizou-se para o sequenciamento, o par de *primers* específico para esta família. Esta reação forneceu uma seqüência nucleotídica com 562pb com 96% de similaridade ao gênero *Streptomyces*, confirmando a identificação prévia.

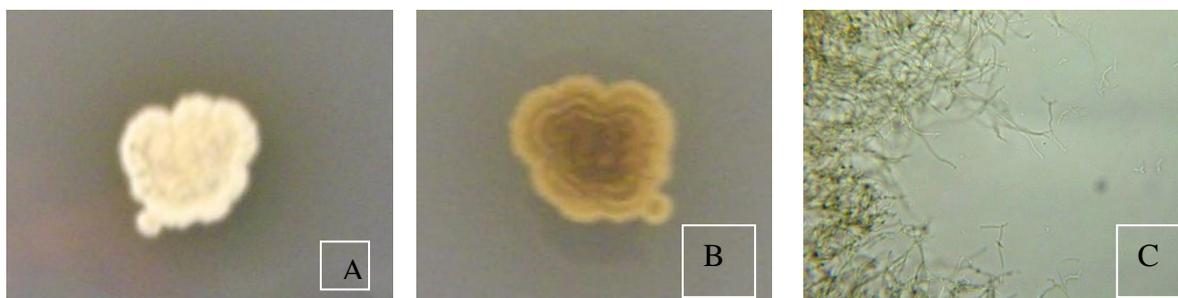


FIGURA 9: IDENTIFICAÇÃO DO ACTINOMICETO POR MACROSCOPIA E MICROSCOPIA

A – Macroscopia da colônia (verso) com 7 dias de crescimento em meio BDA (item 4.1.5)

B – Macroscopia da colônia (reverso) com 7 dias de crescimento em meio BDA (item 4.1.5)

C – Microscopia (aumento 1000X)

FONTE: O autor (2009).

5.4 Seleção dos endófitos para a extração dos metabólitos secundários

Dos 128 fungos filamentosos analisados foram selecionados 52 com características macromorfológicas distintas. Dois actinomicetos também foram selecionados para o estudo.

Dentre todos os endófitos selecionados macromorfológicamente 16 causaram uma inibição superior a 50% do crescimento do fitopatógeno *Guignardia citricarpa* no ensaio de pareamento e, portanto, foram classificados para a extração do líquido metabólico. As percentagens de inibição dos fungos selecionados estão descritas na TABELA 4, os demais fungos filamentosos não apresentaram um percentual de inibição satisfatório.

TABELA 4 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa* PELOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi PELO MÉTODO DE PAREAMENTO

Endófitico	Inibição (%)	Endófitico	Inibição (%)
LGMF625	93,55	LGMF659	75,5
LGMF658	92,45	<i>Alternaria</i> sp. - LGMF692	75,5
Basideomiceto - LGMF713	92,4	<i>Alternaria</i> sp. - LGMF626	75
LGMF682	84,4	<i>Phomopsis</i> sp. - LGMF694	73,6
LGMF701	84,4	LGMF695	73,6
LGMF657	81,1	LGMF653	73,6
LGMF714	80	LGMF651	71,87
<i>Penicillium roseopurpureum</i> - LGMF698	77,27	<i>Phomopsis</i> sp. - LGMF655	54,7

FONTE: O autor (2008)

De acordo com a análise estatística realizada os dados do pareamento são significativos quando $p < 0.01$. Pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) os diâmetros das colônias do fungo *G. citricarpa* na presença dos fungos filamentosos diferem estatisticamente do controle (APÊNDICE 1).

Dos 54 isolados endofíticos ensaiados contra os patógenos *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* sete fungos filamentosos e um actinomiceto apresentaram atividade antimicrobiana. Neste ensaio o isolado de *Streptomyces* sp. (LGMF696) se

destaca por apresentar um halo de inibição contra a levedura bastante superior ao controle. Os resultados dos endófitos que apresentaram halo de inibição para algum dos microrganismos testados podem ser visualizados na TABELA 5.

TABELA 5 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO PELA METODOLOGIA DE INSERÇÃO DE DISCOS DOS ENDÓFITOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi EM UM MEIO SÓLIDO CONTENDO UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA, UMA GRAM-POSITIVA OU UMA LEVEDURA

ATIVIDADE ENDÓFITO x MICRORGANISMO (medida do halo de inibição)			
Endófito	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
LGMF625	16 – 18mm	X	X
<i>Phomopsis</i> sp. – LGMF627	15 – 16mm	X	X
<i>Alternaria</i> sp. - LGMF692	X	10mm	X
LGMF695	10 – 15mm	X	X
<i>Streptomyces</i> sp. – LGMF696	X	X	33 – 35mm
<i>Penicillium roseopurpureum</i> - LGMF698	X	23 – 29mm	X
LGMF700	12 – 18mm	X	X
LGMF673	X	13mm	X
Controle positivo (cloranfenicol 8mg/mL) (nistatina 100000UI/mL)	18mm	30mm	21mm

FONTE: O autor (2009)

NOTA: X = ausência de halo de inibição

OBS: a presença da medida de halo de inibição sugere a presença de compostos com atividade antimicrobiana

Os endófitos citados na TABELA 5 também foram selecionados para a extração do líquido metabólico.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos

5.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos microrganismos endofíticos pelo método de bioautografia

Devido aos resultados anteriores, de pareamento contra *G. citricarpa* e confronto endófito contra microrganismos patogênicos, vinte isolados endofíticos foram selecionados para avaliação da atividade dos metabólitos secundários e foram ensaiados pelo método de bioautografia. Destes, três (dois fungos filamentosos e um actinomiceto) apresentaram atividade contra pelo menos um dos patógenos testados (FIGURA 10-12). Os fungos filamentosos foram ativos contra *S. aureus* e o actinomiceto contra *C. albicans*.

O crescimento do fungo *Phomopsis* sp., isolado LGMF655, em meio MPE (item 4.1.6) com incubação de 24 horas a 28°C sob agitação a 120rpm forneceu metabólitos ativos contra *S. aureus*. Este fungo foi selecionado apenas pela atividade apresentada no pareamento contra *G. citricarpa* demonstrando que este método auxiliou nas buscas de fungos produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana. A FIGURA 10 demonstra as etapas de seleção do fungo endofítico para a fermentação até a confirmação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia.



FIGURA 10 – SELEÇÃO DO FUNGO *Phomopsis* sp. (LGMF655) PARA FERMENTAÇÃO E DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR BIOAUTOGRAFIA DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DA INCUBAÇÃO DO FUNGO POR 24 HORAS EM MEIO MPE

A - seleção macroscópica do fungo *Phomopsis* sp. (LGMF655) em meio BDA

B - seleção por pareamento contra o fitopatógeno *G. citricarpa* (54,7%)

C - atividade antimicrobiana do extrato fúngico de *Phomopsis* sp. (LGMF655) por bioautografia

1- atividade fungo *Phomopsis* sp. (LGMF655) contra *S. aureus*

2 e 3- ausência de atividade

4- controle positivo

FONTE: O autor (2009)

Outro fungo que liberou no meio metabólitos ativos contra *S. aureus* foi um isolado de *Alternaria* sp. (isolado LGMF692) quando incubado em meio MPE (item 4.1.6) por sete dias a 28°C sob agitação a 120rpm. Tanto o pareamento contra *G. citricarpa* quanto o confronto contra *S. aureus* indicaram que este fungo seria promissor para a produção de compostos ativos. A FIGURA 11 demonstra as etapas de seleção até a confirmação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia.

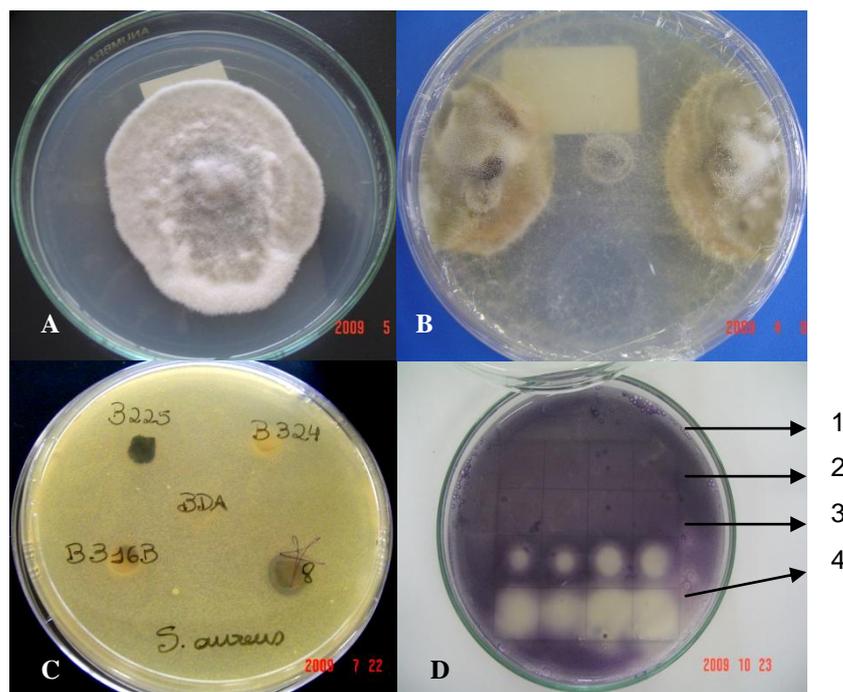


FIGURA 11 – SELEÇÃO DO FUNGO *Alternaria* sp. (LGMF692) PARA FERMENTAÇÃO E DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR BIOAUTOGRAFIA DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DA INCUBAÇÃO DO FUNGO POR 7 DIAS EM MEIO MPE

A - seleção macroscópica do fungo *Alternaria* sp. (LGMF692) em meio BDA

B - seleção por pareamento contra o fitopatógeno *G. citricarpa* (75,5%)

C - seleção por confronto endofítico contra *S. aureus* (10mm)

D - atividade antimicrobiana do extrato fúngico de *Alternaria* sp. (LGMF692) por bioautografia

1 e 2- ausência de atividade

3- atividade de *Alternaria* sp. (LGMF692) contra *S.aureus*

4- controle positivo

FONTE: O autor (2009)

O actinomiceto *Streptomyces* sp. (isolado LGMF696), selecionado pela importante atividade que apresentou quando confrontado diretamente contra *C. albicans*, também teve a propriedade de liberar compostos ativos no meio de cultivo contra o mesmo patógeno. Estes metabólitos foram captados tanto no meio MPE (item 4.1.6) quanto no meio Czapeck (item 4.1.4), demonstrando que ambos os meios podem ser utilizados para a obtenção de componentes provenientes do metabolismo secundário deste actinomiceto. O período de incubação que permitiu a extração dos compostos nos dois meios utilizados foi de sete dias a 28°C com 120rpm de agitação. A FIGURA 12 demonstra as etapas de seleção até a confirmação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia.

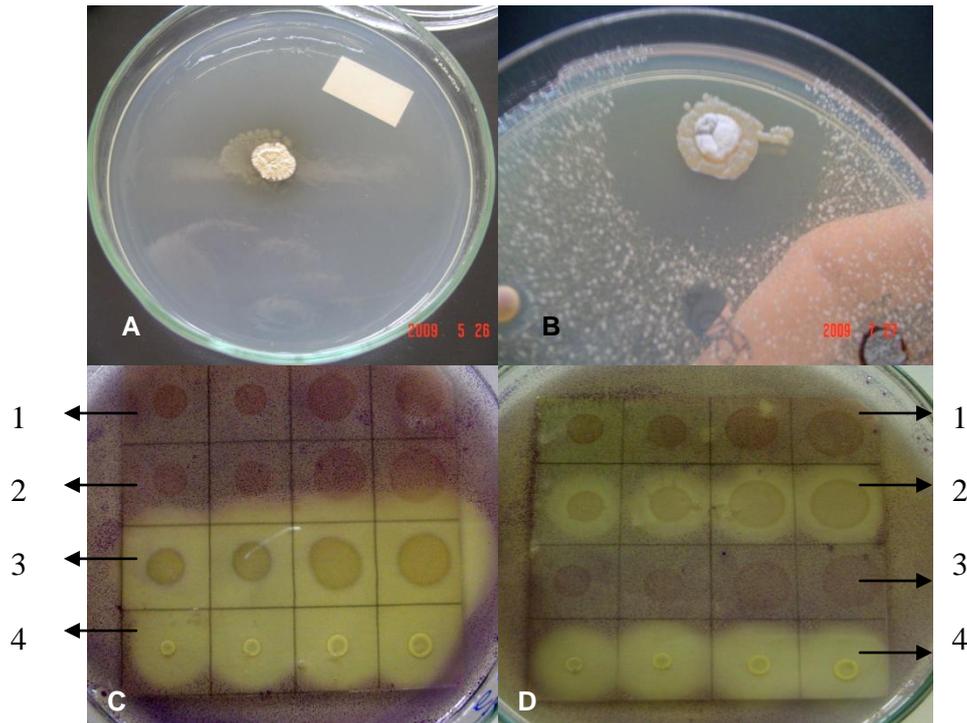


FIGURA 12 – SELEÇÃO DE *Streptomyces* sp. (LGMF696) PARA FERMENTAÇÃO E DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR BIOAUTOGRAFIA DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DA INCUBAÇÃO DO ENDÓFITO POR 7 DIAS EM MEIO MPE E POR 7 DIAS EM MEIO CZAPECK

A - seleção macroscópica do actinomiceto LGMF696 em meio BDA

B - seleção por confronto de *Streptomyces* sp. contra *C. albicans* (33 – 35mm)

C - atividade antimicrobiana do extrato de *Streptomyces* sp. (LGMF696) obtido em meio MPE por bioautografia

1 e 2- ausência de atividade

3- atividade contra *C. albicans*

4- controle positivo

D - atividade antimicrobiana do extrato de *Streptomyces* sp. (LGMF696) obtido em meio Czapeck por bioautografia

1 e 3- ausência de atividade

2- atividade contra *C. albicans*

4- controle positivo

FONTE: O autor (2009)

5.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos microrganismos endofíticos das folhas da aroeira contra *Guignardia citricarpa*

A atividade dos líquidos metabólicos testados contra o fitopatógeno foi avaliada em dois tempos de incubação, sete dias (TABELA 6) e 14 dias (TABELA 7). Com sete dias de incubação apenas dois extratos fúngicos apresentaram inibição do crescimento de *G. citricarpa* superior ou igual a 40% e com 14 dias três deles apresentaram percentagem semelhante.

TABELA 6– PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa* PELOS LÍQUIDOS METABÓLICOS DOS FUNGOS ENDÓFITOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* APÓS SETE DIAS DE INCUBAÇÃO

ATIVIDADE EXTRATO FÚNGICO X <i>Guignardia</i> (PI%) – 7 dias				
ISOLADOS	EXTRATO 1	EXTRATO 2	EXTRATO 3	EXTRATO 4
LGFM625	6,25%	-18,75%	0%	-37,5%
<i>Alternaria</i> sp. – LGMF626	13,72%	9,80%	16,66%	1,96%
LGMF657	-7,80%	0%	-13,72%	12,5%
LGMF658	21,87%	12,5%	0%	47,5%
LGMF659	12,5%	0%	-25%	6,25%
LGMF682	18,75%	37,5%	-31,25%	6,25%
<i>Alternaria</i> sp. - LGMF692	-12,5%	12,5%	0%	10%
<i>Penicillium roseopurpureum</i> – LGMF698	12,5%	40%	15%	-12,5%
LGMF701	-12,5%	25%	-37,5%	-31,25%
Basideomiceto - LGMF713	9,00%	-7,46%	33,00%	-1,50%
LGMF714	25,37%	-11,00%	20,89%	16,00%
Controle positivo (glifosinato 10mg/mL) – 100%				
Controle solvente (metanol) – 10,45%				
Extrato bruto metabólico folhas aroeira – 43,75%				

FONTE: O autor (2009)

NOTA: EXTRATO 1 = obtido do cultivo do fungo em meio MPE por 24 horas
 EXTRATO 2 = obtido do cultivo do fungo em meio MPE por 7 dias
 EXTRATO 3 = obtido do cultivo do fungo em meio Czapeck por 24 horas
 EXTRATO 4 = obtido do cultivo do fungo em meio Czapeck por 7 dias

Com sete dias de incubação o controle positivo (glifosinato 10mg/mL) resultou em 100% de inibição do fitopatógeno, enquanto o solvente utilizado para ressuspender os extratos, o metanol, apresentou um pequeno potencial de inibição de crescimento do fungo, o qual foi de 10,45%. Com sete dias de incubação o

extrato bruto metanólico da aroeira inibiu em 43,75% o crescimento da *G. citricarpa* e apenas dois extratos fúngicos demonstraram uma redução maior ou igual a 40% no crescimento do fitopatógeno, eles foram obtidos do isolado LGMF658 cultivado em meio Czapeck (item 4.1.4) por sete dias e de *Penicillium roseopurpureum*, isolado LGMF698, cultivado em meio MPE (item 4.1.6) por sete dias (TABELA 6).

TABELA 7 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa* PELOS LÍQUIDOS METABÓLICOS DOS FUNGOS ENDÓFITOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* APÓS QUATORZE DIAS DE INCUBAÇÃO

ATIVIDADE EXTRATO FÚNGICO X <i>Guignardia</i> (PI%) – 14 dias				
ISOLADOS	EXTRATO 1	EXTRATO 2	EXTRATO 3	EXTRATO 4
LGMF625	12,69%	-19,05%	-7,14%	-15,08%
<i>Alternaria</i> sp. – LGMF626	18%	16%	20%	11%
LGMF657	12,5%	12,69%	15%	20,63%
LGMF658	23,01%	-3,17%	0,79%	46,82%
LGMF659	28,57%	4,76%	-38,9%	-11,11%
LGMF682	36,5%	48,41%	-19,05%	4,76%
<i>Alternaria</i> sp. - LGMF692	-3,17%	40,47%	-7,14%	19,04%
<i>Penicillium roseopurpureum</i> – LGMF698	16,66%	25,39%	15,87%	-30,95%
LGMF701	-23,01%	-23,01%	-42,87%	-86,50%
Basideomiceto - LGMF713	7,41%	-3,90%	13,42%	11,76%
LGMF714	4,90%	-6,50%	18,63%	9,26%
Controle positivo (glifosinato 10mg/mL) – 100%				
Controle solvente (metanol) – 0,98%				
Extrato bruto metabólico folhas aroeira – 28,57%				

FONTE: O autor (2009)

NOTA: EXTRATO 1 = obtido do cultivo do fungo em meio MPE por 24 horas

EXTRATO 2 = obtido do cultivo do fungo em meio MPE por 7 dias

EXTRATO 3 = obtido do cultivo do fungo em meio Czapeck por 24 horas

EXTRATO 4 = obtido do cultivo do fungo em meio Czapeck por 7 dias

Com duas semanas de incubação o controle positivo manteve a inibição do fitopatógeno em 100%. A atividade do extrato bruto metanólico das folhas de aroeira foi reduzida a 28,57%. Com duas semanas de incubação os efeitos do solvente sobre o crescimento fúngico foram minimizados, neste tempo a inibição do metanol foi de apenas 0,98%. Apenas um dos extratos fúngicos (obtido do isolado LGMF658 cultivado em meio Czapeck - item 4.1.4 - por sete dias) que apresentou uma redução razoável no crescimento do patógeno já com sete dias manteve a atividade praticamente constante com duas semanas de cultivo. Outros dois extratos demonstraram o controle do crescimento apenas em longo prazo, eles foram obtidos

do isolado LGMF682 cultivado em meio MPE (item 4.1.6) por sete dias e de *Alternaria* sp., isolado LGMF692, cultivado em meio MPE por sete dias (TABELA 7).

De acordo com a análise estatística, os dados da avaliação da atividade dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila a partir do meio de cultivo dos microrganismos endofíticos contra *Guignardia citricarpa* são significativos quando $p < 0.01$ (APÊNDICES 2 e 3).

O extrato fúngico que foi mais eficiente na inibição do fitopatógeno *G. citricarpa*, no sentido de constância de inibição, foi o obtido do cultivo do isolado LGMF658 em meio Czapeck por sete dias. As FIGURAS 13 e 14 ilustram o controle do crescimento do fitopatógeno com uma e duas semanas de incubação.

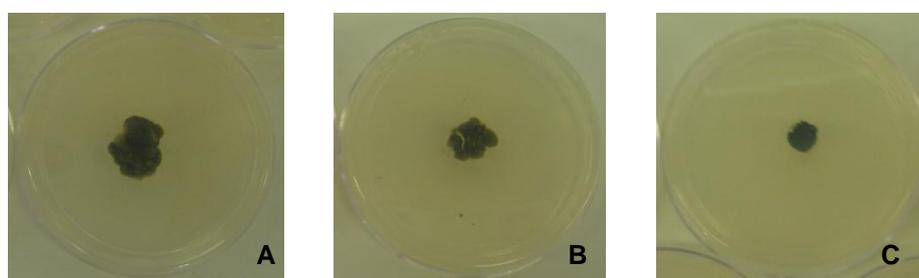


FIGURA 13 – AÇÃO DO LÍQUIDO METABÓLICO OBTIDO DO CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO LGMF658, EM MEIO CZAPECK POR SETE DIAS, NA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa* APÓS 7 DIAS

A – *G. citricarpa* controle negativo

B – *G. citricarpa* em contato com o extrato do fungo LGMF658 obtido com incubação em Czapeck por 7 dias

C – controle positivo, *G. citricarpa* crescendo na presença de GLIFOSINATO a 10mg/mL

FONTE: O autor (2009)

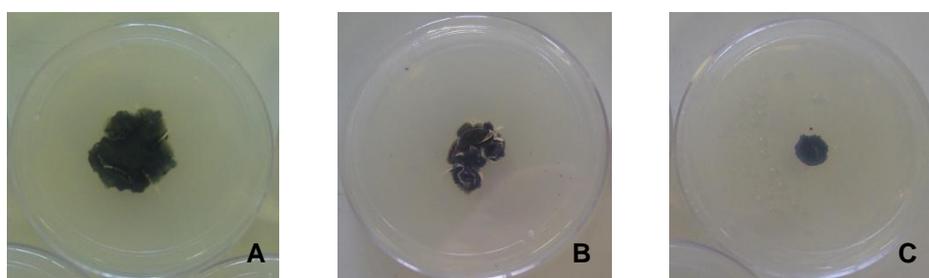


FIGURA 14 – AÇÃO DO LÍQUIDO METABÓLICO OBTIDO DO CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO LGMF658, EM MEIO CZAPECK POR SETE DIAS, NA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa* APÓS 14 DIAS

A – *G. citricarpa* controle negativo

B – *G. citricarpa* em contato com o extrato do fungo LGMF658 obtido com incubação em Czapeck por 7 dias

C – controle positivo, *G. citricarpa* crescendo na presença de GLIFOSINATO a 10mg/mL

FONTE: O autor (2009)

5.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto pelo método dos poços

Oito isolados endofíticos, sete fungos filamentosos e um actinomiceto, continham metabólitos secundários com atividade antimicrobiana retidos em suas estruturas celulares. O extrato do fungo *Alternaria* sp. (LGMF626) apresentou atividade apenas contra *S. aureus* quando cultivado por sete dias em meio Czapeck (item 4.1.4). O extrato do fungo *Phomopsis* sp. (LGMF627) foi ativo contra *C. albicans* quando incubado por um dia em meio Czapeck (item 4.1.4). O extrato do fungo LGMF673 produziu metabólitos ativos contra *C. albicans* e *S. aureus* com 24 horas de incubação tanto no meio MPE (item 4.1.6) como no meio Czapeck (item 4.1.4), e com sete de cultivo em meio Czapeck foram isolados compostos ativos apenas contra *C. albicans*. A produção de metabólitos ativos do fungo *Alternaria* sp. (LGMF692) ocorreu com sete dias de incubação em meio MPE (item 4.1.6), sendo que estes metabólitos atuaram contra *S. aureus*. Do fungo *Phomopsis* sp. (LGMF694) foram isolados compostos ativos contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* do meio Czapeck (item 4.1.4) após sete dias de incubação. O fungo *Penicillium roseopurpureum* (LGMF698) apresentou metabólitos ativos retidos em suas estruturas celulares com um dia de incubação tanto no meio MPE (item 4.1.6) como no meio Czapeck (item 4.1.4), sendo que em ambos foram encontrados compostos ativos contra *C. albicans*, porém só no meio Czapeck (item 4.1.4) foram isolados os ativos contra *S. aureus*. O basideomiceto (LGMF713) continha compostos ativos contra *S. aureus* após um dia de incubação em meio Czapeck (item 4.1.4). O actinomiceto *Streptomyces* sp. (LGMF696) apresentou compostos ativos contra *C. albicans* com um dia de incubação em meio MPE (item 4.1.6) e Czapeck (item 4.1.4), e com sete dias de incubação em meio Czapeck (item 4.1.4). A atividade contra *S. aureus* só foi observada com sete dias de incubação em meio MPE (item 4.1.6). Estes dados podem ser visualizados na TABELA 8, a qual mostra os códigos dos microrganismos dos quais os extratos foram ativos, o meio de cultivo utilizado, o tempo de incubação, contra qual patógeno ele foi ativo e o diâmetro do halo de inibição encontrado.

TABELA 8 - DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DOS PATÓGENOS *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* PELOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DOS MICÉLIOS FÚNGICOS E DA MASSA CELULAR DO ACTINOMICETO ENDOFÍTICOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi PELO MÉTODO DOS POÇOS

ENDÓFITO	MPE 24h	MPE 7dias	Czapeck 24h	Czapeck 7dias
<i>Alternaria</i> sp. - LGMF626	X	X	X	<i>S. aureus</i> (20mm)
<i>Phomopsis</i> sp. - LGMF627	X	X	<i>C. albicans</i> (13mm e 15mm)	X
LGMF673	<i>S. aureus</i> (15mm e 15mm) <i>C. albicans</i> (28mm e 30mm)	X	<i>S. aureus</i> (19mm e 20mm) <i>C. albicans</i> (30mm e 33mm)	<i>C. albicans</i> (20mm e 24mm)
<i>Alternaria</i> sp. - LGMF692	X	<i>S. aureus</i> (10mm e 11mm)	X	X
<i>Phomopsis</i> sp. - LGMF694	X	X	X	<i>P. aeruginosa</i> (14mm e 15mm) <i>S. aureus</i> (18mm e 20mm)
<i>Streptomyces</i> sp. - LGMF696	<i>C. albicans</i> (27mm e 28mm)	X	<i>C. albicans</i> (16mm e 17mm)	<i>S. aureus</i> (15mm) <i>C. albicans</i> (20mm)
<i>Penicillium roseopurpureum</i> - LGMF698	<i>C. albicans</i> (10mm)	X	<i>S. aureus</i> (15mm) <i>C. albicans</i> (16mm e 18mm)	X
Basideomiceto – LGMF713	X	X	<i>S. aureus</i> (10mm)	X

FONTE: O autor (2009)

NOTA: X = ausência de halo de inibição

Controle positivo – Cloranfenicol 8mg/mL: *P. aeruginosa* 18mm; *S. aureus* 30mm

- Nistatina 100000UI/mL: *C. albicans* 21mm

A FIGURA 15 ilustra a metodologia com três resultados positivos contra *C. albicans* e os controles necessários, que incluem o do solvente (metanol), o controle negativo (solução fisiológica - 0,9% NaCl) e o positivo (nistatina 100.000UI/mL).

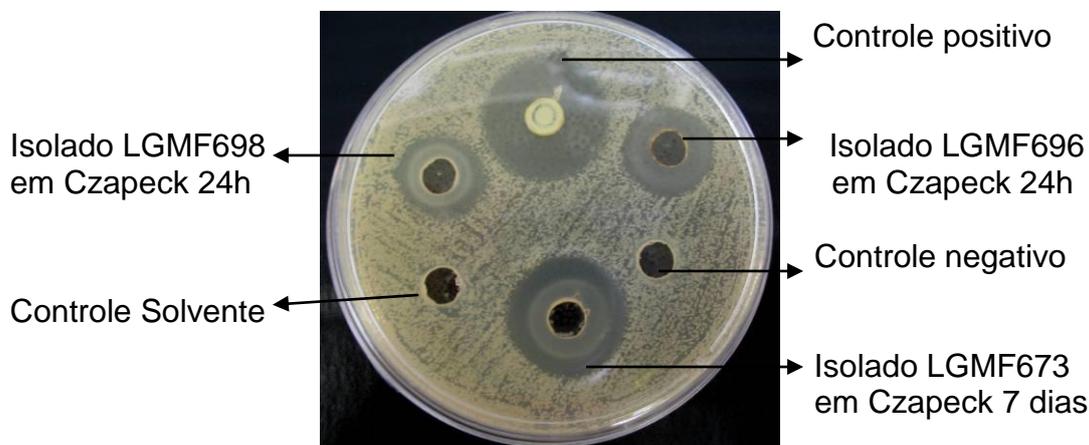


FIGURA 15 – HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Candida albicans* PELO MÉTODO DOS POÇOS NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS DAS CÉLULAS DOS ENDÓFITOS *Penicillium roseopurpureum* (LGMF698), *Streptomyces* sp. (LGMF696) E LGMF673 APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Controle solvente = metanol; Controle positivo = nistatina (100.000UI/mL); Controle negativo (solução fisiológica - 0,9% NaCl)

5.5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo após a extração com acetato de etila

De todos os meios avaliados houve apenas dois casos de compostos ativos, ambos contra *C. albicans*, permanecerem retidos no meio de cultivo após a extração com acetato de etila. Eles eram provenientes do crescimento do mesmo microrganismo, o actinomiceto identificado pelo código LGMF696, no meio MPE (item 4.1.6) cultivado por sete dias e no meio Czapeck (item 4.1.4) incubado pelo mesmo período de tempo.

5.6 Caracterização química dos compostos ativos do extrato metanólico bruto das folhas de aroeira e suas frações e dos metabólitos ativos extraídos dos endófitos das folhas de aroeira

Os extratos metanólicos brutos das folhas de aroeira bem como suas frações foram analisados em cromatografia em camada delgada a fim de identificar os compostos ativos. Igualmente, os líquidos metabólicos dos endófitos desta planta foram avaliados quimicamente (FIGURAS 16 – 19). Os resultados das cromatografias em camada delgada sugerem que o extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e suas frações ativas (diclorometano:acetato de etila 1:1 e acetato de etila) apresentam compostos fenólicos e antraquinonas (TABELA 9). Ainda, o extrato bruto metanólico e a fração de acetato de etila, de acordo com os resultados obtidos, possuem alcalóides e terpenóides.

A análise química dos compostos com atividade antimicrobiana extraídos dos microrganismos endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi sugere a presença de alcalóides em todos os extratos analisados. Dois microrganismos (*Alternaria* sp. - LGMF692 e *Streptomyces* sp. - LGMF696) produziram também antraquinonas e um deles (*Phomopsis* sp. - LGMF655) terpenóides (FIGURAS 16 - 19).

A análise das placas de cromatografia em camada delgada está resumida na TABELA 9.

O revelador anisaldeído (FIGURA 16), não descrito na TABELA 9, e a luz ultravioleta, em ambos os comprimentos de onda, demonstram que para o extrato e frações da planta todos os compostos que puderam ser visualizados pela metodologia foram corados com algum revelador apresentado na tabela acima, porém, para os endófitos a grande maioria dos compostos não foi detectada pelos reveladores testados, provavelmente porque eles apresentam classes químicas diferentes das pesquisadas, fato que destaca a capacidade que estes microrganismos têm em produzir diferentes classes de compostos secundários e, conseqüentemente, a riqueza de seus extratos.

TABELA 9 – ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Schinus terebentifolius* Raddi (EXTRATO METANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO DICLOROMETANO:ACETATO DE ETILA E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E DOS EXTRATOS DOS SEUS ENDÓFITOS QUE TAMBÉM APRESENTARAM ATIVIDADE

	Alcalóides	Compostos Nitrogenados	Antraquinonas	Cumarinas	Terpenóides	Ácidos Graxos	Compostos Fenólicos
Extrato Bruto Aroeira	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
Fração diclorometano: acetato de etila	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS
Fração acetato de etila	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
<i>Alternaria</i> sp. (LGMF692)	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Phomopsis</i> sp. (LGMF694)	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Streptomyces</i> sp. (LGMF696)	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Penicillium roseopurpureum</i> (LGMF698)	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Basideomiceto (LGMF713)	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Alternaria</i> sp. (LGMF626)	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Phomopsis</i> sp. (LGMF627)	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Phomopsis</i> sp. (LGMF655)	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
LGMF673	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

FONTE: O autor (2009).

NOTA: POS = resultado positivo

NEG = resultado negativo

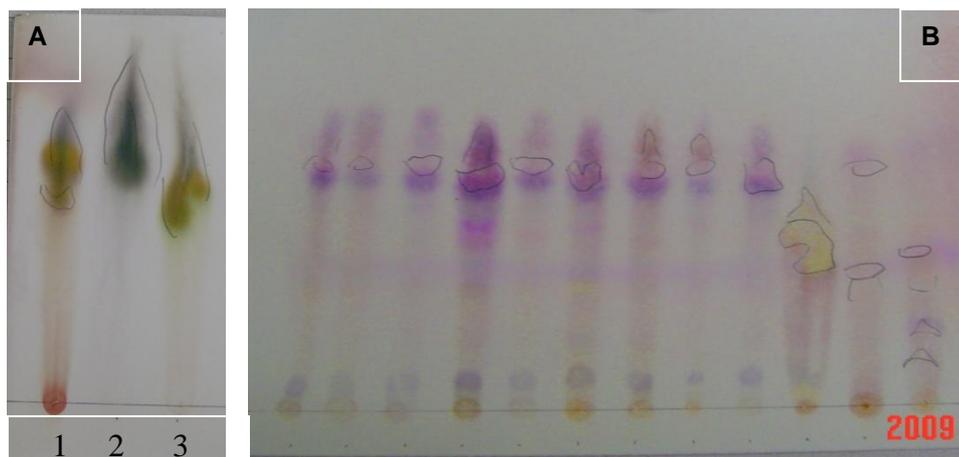


FIGURA 16 – REVELAÇÃO DAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM ANISALDEÍDO, REVELADOR UNIVERSAL

LEGENDA: A – Placa contendo o extrato bruto das folhas de aroeira e suas frações ativas

- 1 – Extrato bruto metanólico das folhas de aroeira;
- 2 – Fração diclorometano:acetato de etila do extrato das folhas de aroeira;
- 3 – Fração acetato de etila do extrato das folhas de aroeira.

B – Placa contendo alguns extratos ativos de endófitos das folhas de aroeira

FONTE: O autor (2009)

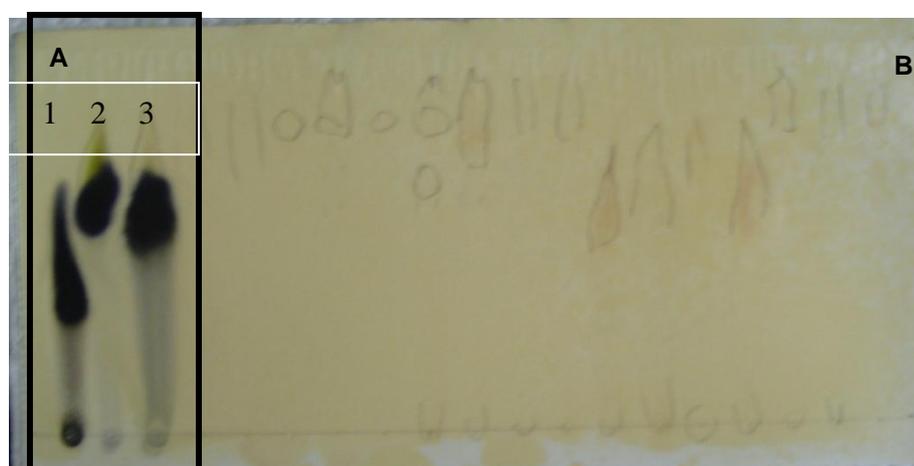


FIGURA 17 – REVELAÇÃO DAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM CLORETO FÉRRICO PARA VISUALIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM PRETO

LEGENDA: A – Placa contendo o extrato bruto das folhas de aroeira e suas frações ativas

- 1 – Extrato bruto metanólico das folhas de aroeira;
- 2 – Fração diclorometano:acetato de etila do extrato das folhas de aroeira;
- 3 – Fração acetato de etila do extrato das folhas de aroeira.

B – Placa contendo alguns extratos ativos de endófitos das folhas de aroeira

FONTE: O autor (2009)

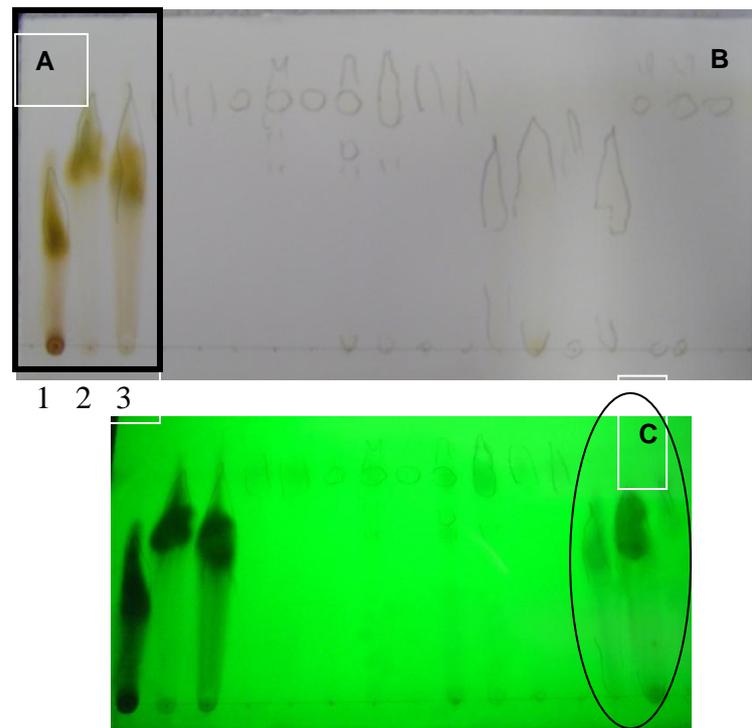


FIGURA 18 – REVELAÇÃO DAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO PARA VISUALIZAÇÃO DAS ANTRAQUINONAS EM VERMELHO-AMARELO

LEGENDA: A – Placa contendo o extrato bruto das folhas de aroeira e suas frações ativas

1 – Extrato bruto metanólico das folhas de aroeira;

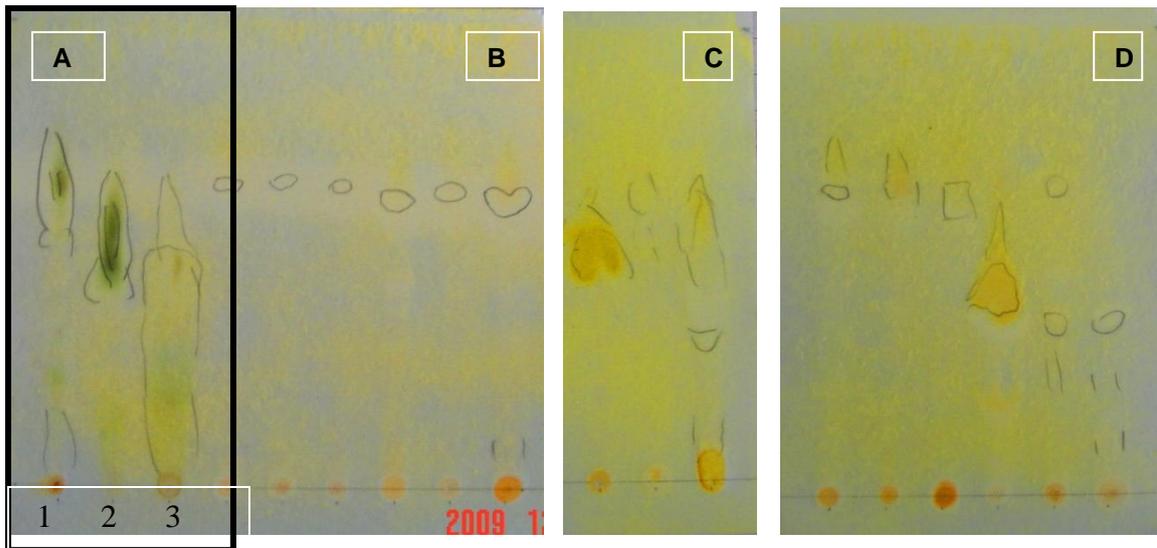
2 – Fração diclorometano:acetato de etila do extrato das folhas de aroeira;

3 – Fração acetato de etila do extrato das folhas de aroeira.

B – Placa contendo alguns extratos ativos de endófitos das folhas de aroeira

C – Mesma placa revelada com hidróxido de potássio, porém vista em luz ultravioleta, permitindo a visualização da mancha formada possivelmente por antraquinonas presentes em extratos de dois endófitos, *Alternaria* sp. (LGMF692) e *Streptomyces* sp. (LGMF696)

FONTE: O autor (2009)



FIGUR 19 – REVELAÇÃO DAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM REATIVO DE DRAGENDORFF PARA VISUALIZAÇÃO DE ALCALÓIDES EM AMARELO ALARANJADO

LEGENDA: A – Placa contendo o extrato bruto das folhas de aroeira e suas frações ativas

- 1 – Extrato bruto metanólico das folhas de aroeira;
- 2 – Fração diclorometano:acetato de etila do extrato das folhas de aroeira;
- 3 – Fração acetato de etila do extrato das folhas de aroeira.

B, C e D – Placas contendo alguns extratos ativos de endófitos das folhas de aroeira

FONTE: O autor (2009)

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e de suas frações obtido a partir das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

6.1.1 Obtenção do extrato metanólico bruto das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e seu fracionamento

A escolha das folhas para o estudo foi definida por esta ser a porção vegetal mais utilizada popularmente para a ação antimicrobiana (FENNER *et al.*, 2006) e por ser a porção da planta mais cientificamente estudada para este fim terapêutico (MARTINES; ALONSO; BETANCOURT, 1996; GUERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY; PARDO, 2005; SCHMOURLO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006; BOROS, 2007; JOHANN *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2007). Ainda, sabe-se que, dos órgãos vegetais da planta, as folhas concentram a maior parte dos polifenóis, suspeitos de serem os compostos que fornecem atividade à planta, indicando uma intensa produção de metabólitos secundários neste órgão (QUEIRES; RODRIGUES, 1998).

Em relação à metodologia de extração, a primeira etapa realizada com éter de petróleo teve como objetivo a extração de compostos altamente apolares, não relacionados com atividade antimicrobiana, com exceção aos óleos essenciais, os quais não foram priorizados no estudo, por isso esta fração foi rejeitada. A segunda etapa, efetuada com metanol, foi a selecionada para a pesquisa por extrair os metabólitos secundários polares das folhas, incluindo compostos fenólicos, fortemente relacionados com a sua atividade antimicrobiana (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY; PARDO, 2005; LIMA *et al.*, 2006; CERUKS *et al.*, 2007).

O rendimento da extração obtido no presente trabalho (24,31%) foi excelente comparado com Boros (2007), que trabalhou com o extrato metanólico bruto das folhas da mesma planta, e obteve uma percentagem de 16,20%. Em relação à partição os dois trabalhos obtiveram resultados semelhantes, sendo que a maioria dos metabólitos secundários obtidos do extrato metanólico bruto das folhas foram

concentrados na fração acetato de etila:metanol (1:1), dado coerente levando em consideração a polaridade do solvente utilizado para a extração.

6.1.2 Ensaios para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e de suas frações

A escolha dos microrganismos para a avaliação da atividade antimicrobiana foi efetuada levando em consideração a presença de ao menos um representante dos seguintes grupos de importância clínica: Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. Dentre os Gram-positivos foi escolhido *Staphylococcus aureus*, pois esta é uma das bactérias com forte tendência a selecionar resistência aos antibióticos, tanto que há isolados clínicos multiresistentes. Entre os Gram-negativos foram selecionadas as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, por ser um patógeno com mecanismos de resistência intrínsecos, dificultando o seu tratamento, e *Escherichia coli* que foi considerada a representante mais sensível, analisando a linhagem selecionada para o estudo, de bastante importância clínica deste grupo e que também possui a característica de selecionar resistência antimicrobiana. A espécie *Candida albicans* representa aqui as leveduras, sua escolha se deve ao fato de que esta levedura é freqüentemente isolada na clínica como patógeno oportunista.

Para os ensaios com os endófitos a espécie *E. coli* não foi utilizada, pois a prioridade de busca de compostos ativos foi dada contra aqueles microrganismos que mais freqüentemente conferem um maior grau de dificuldade ao tratamento.

A escolha do cloranfenicol como controle positivo para as bactérias foi devido seu mecanismo de ação de inibição na síntese de proteínas bacterianas pela ação em seus ribossomos, o que lhe confere uma característica de amplo espectro, ou seja, age tanto contra as bactérias Gram-positivas como contra as Gram-negativas, assim como, por este antibiótico ser ativo contra as linhagens de bactérias selecionadas. A nistatina, antifúngico que altera a permeabilidade da membrana de fungos patogênicos e saprófitos causando a morte celular, foi selecionada como controle positivo contra *C. albicans* por ser o fármaco de escolha contra esta levedura em infecções cutâneas e de mucosa superficial. Ainda, vários

trabalhos relatam o uso destes antimicrobianos como controle positivo (FUCHS e WANNMACHER, 1998).

6.1.2.1 Método dos poços

Utilizando-se de tal metodologia observou-se que o extrato metanólico bruto de aroeira apresentou atividade contra todos os microrganismos testados, sendo que a medida do halo de inibição foi maior para *C. albicans*, seguido de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e, por último, *E. coli*. Esta metodologia foi utilizada apenas como apoio, ou seja, ela forneceu dados para que fossem geradas hipóteses para os resultados da macrodiluição, que é a metodologia *gold standart* para a avaliação de atividade antimicrobiana de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Desta forma, tal metodologia auxiliou na determinação preliminar do número de concentrações que seriam testadas para cada extrato/fração na macrodiluição e garantiu maior confiabilidade dos dados. Sendo assim, no método dos poços, foi utilizada apenas a maior concentração possível dos extratos, assim como no primeiro ensaio de macrodiluição para as frações que não apresentaram atividade no método dos poços. Os resultados apenas foram utilizados para indicar presença ou ausência de atividade do(s) extrato/frações, sem a intenção de determinar qual é o microrganismo mais sensível, pois como os compostos ativos para cada grupo de microrganismos não são conhecidos eles podem diferir entre si. Desta forma, não há como prever a capacidade dos mesmos de se difundir no ágar.

Em um estudo, publicado em 2004 por Lima *et al.*, o extrato aquoso de caules e folhas da aroeira foi testado pela metodologia dos poços e a sua ação foi semelhante com os resultados aqui apresentados, sendo que o maior halo de inibição foi observado para *C. albicans*, seguido de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Porém, Lima *et al.* (2004) não observaram a atividade contra *E. coli*, provavelmente, por terem utilizado uma concentração do extrato bastante inferior ao do presente estudo. Outros estudos, utilizando a mesma metodologia, confirmaram a atividade de compostos polares obtidos a partir de *Schinus terebenthifolius* contra *S. aureus* (SOARES *et al.*, 2006). Também já foi confirmada, por metodologia de mesmo princípio, a atividade do extrato alcoólico dos frutos de aroeira contra *S. aureus*

(DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY; PARDO, 2005). Outra pesquisa que utilizou metodologia semelhante verificou a atividade da tintura da casca de aroeira contra *Streptococcus mutans*, não pesquisada neste estudo, mas que fornece mais um dado de atividade dos metabólitos secundários desta planta, independente da porção utilizada, contra cocos Gram-positivos (SOARES *et al.*, 2007).

A fração do extrato bruto que apresentou atividade contra quase todos os microrganismos analisados, com exceção de *P. aeruginosa*, foi a de diclorometano:acetato de etila (1:1). Novamente, observou-se a formação de halo de inibição superior para *C. albicans* (FIGURA 20). A medida do halo desta fração contra *S. aureus* e *E.coli* foram semelhantes. Apenas para *C. albicans* outra fração, a de acetato de etila, também formou um halo bem definido. As frações de acetato de etila:metanol (1:1) e de metanol pareceram afetar levemente o crescimento de *C. albicans*, mas não promoveram a formação de um halo bem definido, sugerindo a presença de resquícios de composto(s) ativo(s).



FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO:ACETATO DE ETILA (1:1) OBTIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE AROEIRA CONTRA *C. albicans* UTILIZANDO-SE O MÉTODO DOS POÇOS
 FONTE: O autor (2008)

NOTA: Controle positivo = nistatina (100.000UI/mL)

Controle solvente = dimetilsulfóxido

Controle negativo = etanol 30%

O solvente utilizado no(as) extrato/frações não apresentou nenhuma interferência nos resultados, uma vez que não houve formação de halo de inibição quando o mesmo foi utilizado como controle (FIGURA 20).

6.1.2.2 Método da macrodiluição

O ensaio confirma a atividade do extrato bruto metanólico e das frações ativas revelada pelo método anterior. Por ser uma metodologia mais sensível do que a dos poços, na macrodiluição observa-se que a fração de acetato de etila também apresenta atividade contra as bactérias ensaiadas confirmando a presença de metabólito(s) ativo(s). Esta sensibilidade metodológica se dá a um contato mais íntimo entre as substâncias extraídas e o microrganismo, já que ambos estão em uma suspensão, enquanto no método dos poços os compostos necessitam se difundir na barreira formada pelo ágar para alcançarem o contato com o microrganismo. A fração do extrato que melhor concentrou os metabólitos ativos foi a de diclorometano: acetato de etila (1:1). Quimicamente, os resultados sugerem que o(s) composto(s) ativo(s) possui(em) uma polaridade intermediária, pois não se concentraram nem na fração mais apolar (éter de petróleo) nem na mais polar (metanol).

A macrodiluição permite afirmar com mais segurança, em relação ao método dos poços, quais são os microrganismos mais susceptíveis ao(s) extrato/frações. Desta forma, a concentração inibitória mínima da substância obtida é mais fidedigna.

Pela metodologia de macrodiluição observa-se que o extrato metanólico bruto da aroeira apresenta maior atividade contra *C. albicans* seguida por *S. aureus*, já que foi necessária uma concentração menor de extrato para inibir o crescimento destes microrganismos em relação às utilizadas para os Gram-negativos. Apesar de o extrato bruto possuir atividade contra *P. aeruginosa*, confirmada pelas duas metodologias, não foi possível a determinação exata da concentração inibitória mínima, pois a quantidade de extrato necessária para atingir este dado extrapolaria o limite determinado por controle para evitar a influência do solvente sobre o resultado. Entretanto, pode-se afirmar que a CIM de extrato metanólico bruto de folhas de aroeira é superior a 3600µg/mL para *P. aeruginosa*.

As mesmas frações que se apresentaram ativas na metodologia dos poços, a de diclorometano:acetato de etila e a de acetato de etila, também mostraram atividade pelo método da macrodiluição. Porém, pela sensibilidade do segundo método, o espectro de ação foi ampliado. Ambas as frações apresentaram resultados semelhantes quanto ao espectro de ação. As frações foram mais ativas

contra o microrganismo Gram-positivo, seguido dos Gram-negativos e com uma menor ação contra a levedura ensaiada. Tal resultado difere da atividade antimicrobiana encontrada para o extrato bruto desta planta, provavelmente porque neste há uma interação de compostos que potencializa a atividade contra *C. albicans*. Assim, quando o extrato é fracionado, tais compostos são separados reduzindo o potencial de ação. Em outro trabalho que estudou a atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi foi verificado que o extrato aquoso perdia a atividade contra *C. albicans* quando fracionado (SCHMOURLO *et al.*, 2005), confirmando a importância do sinergismo neste caso. Não foi possível encontrar a concentração inibitória mínima das frações para *C. albicans*, pois para isso seria necessário um volume de amostra superior ao permitido para que não houvesse influência do solvente. É possível afirmar que a CIM para *C. albicans* é superior a 2300µg/mL para ambas as frações positivas, sendo a de diclorometano:acetato de etila (1:1) a mais ativa por apresentar um menor número de colônias. Nesta fração observou-se aproximadamente quinze colônias, na maior concentração testada, enquanto a fração de acetato de etila apresentou aproximadamente noventa colônias.

Aparentemente as interações de compostos que favorecem a atividade do extrato bruto em relação às frações contra a levedura não surtem o mesmo efeito para as bactérias ensaiadas, já que em todos os casos a concentração inibitória foi significativamente reduzida em relação ao extrato bruto. Isso indica uma maior concentração dos compostos ativos contra esses microrganismos ou uma eliminação/redução de compostos interferentes, principalmente na fração de diclorometano:acetato de etila (1:1). As frações foram mais ativas contra a bactéria Gram-positiva do que contra as Gram-negativas.

A redução na concentração inibitória mínima, para *S. aureus* e *E. coli*, do extrato bruto em relação às frações ativas chama muito a atenção (TABELA 3), principalmente para a fração diclorometano:acetato de etila, que é, no mínimo, três vezes mais ativa que o extrato bruto das folhas de aroeira.

Outro estudo buscou a atividade antimicrobiana das frações separadamente, porém não encontrou atividade em nenhuma delas (Boros, 2007). Tal fato pode ter ocorrido pelo meio de cultura utilizado (BHI) para a metodologia em meio líquido, o qual pode ter interferido no resultado e discordado do presente estudo. O meio de escolha para testes antimicrobianos, de acordo com Koneman *et al.* (2008), é o

Müeller-Hinton (itens 4.1.1 e 4.1.3), que permite o crescimento satisfatório da maioria dos patógenos e tem efeito inibidor mínimo para substâncias antimicrobianas.

O solvente acetato de etila possui uma polaridade que permite a extração de polifenóis, compostos aos quais vem sendo atribuída a atividade antimicrobiana de aroeira. Tal fato reforça a confiabilidade dos resultados obtidos no presente trabalho (ANDREO; JORGE, 2006; QUEIRES *et al.*, 2006).

Confrontando os resultados obtidos na metodologia dos poços e na macrodiluição é confirmada a superioridade do segundo método. No método dos poços foram verificados diversos resultados falso-negativos, portanto, sempre que possível, devemos optar pela macrodiluição na avaliação de atividade antimicrobiana de extratos.

6.2 Isolamento de endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

A freqüência de isolamento realizada no mês de setembro de 2008 foi de 76%, enquanto no mês de março de 2009 foi de 50%. Utilizando a mesma planta, Lima (2008) obteve freqüências superiores de isolamento, 97,5% e 79%. Os menores valores obtidos no presente trabalho pode ser conseqüência do vasto crescimento de alguns fungos impossibilitando o isolamento dos endófitos.

Gao *et al.* (2005) estudaram os endófitos da planta *Heterosmilax japonica* Kunth e também obtiveram maior freqüência de isolamento de fungos na primavera comparada ao verão. Este fato ressaltava a importância de pesquisar a presença de endófitos em diferentes estações do ano visando a recuperação de maior variabilidade de espécies.

6.3 Identificação dos microrganismos endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

No presente trabalho foram identificados como endófitos das folhas de aroeira, através das características macro e microscópicas e seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium roseopurpureum*, *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp. *Colletotrichum* sp. e *Trichaptum* sp.. Foi também identificado um isolado de actinomiceto pertencente ao gênero *Streptomyces*. Em um estudo de identificação dos fungos presentes nas sementes de *Schinus terebenthifolius* Raddi também foram encontrados os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium*, o que pode ser um indício de transmissão vertical destes microrganismos (STRAPASSON; SANTOS; MEDEIROS, 2002).

Todos os microrganismos citados acima já foram descritos como produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana. Do gênero *Alternaria* já foram isolados os ácidos xanaltéricos I e II ativos contra *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA) e a altenusina ativa contra MRSA, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus cloacae*, *Streptococcus pneumonia*, *Candida albicans* e *Aspergillus faecalis* (KJER *et al.*, 2009).

Do gênero *Phomopsis* as citosporonas B e C apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Fusarium oxysporum* (HUANG *et al.*, 2008), as phomolidas A e B e um derivado do benzofurano apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (DU *et al.*, 2008), ainda, outros trabalhos relatam atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir da fermentação de isolados endofíticos do gênero *Phomopsis* sp., extraídos com acetato de etila, porém não os caracterizam quimicamente (PHONGPAICHIT *et al.*, 2006; CORRADO; RODRIGUES, 2004).

Para o gênero *Penicillium* a produção de compostos antimicrobianos é praticamente indiscutível já que o primeiro antibiótico isolado a penicilina, foi obtido a partir do cultivo deste microrganismo. Mais recentemente novos compostos biologicamente ativos foram extraídos de fungos endofíticos deste gênero. Entre eles um tetrapeptídeo com atividade antifúngica isolado de *Penicillium canescens* (BERTINETTI; PEÑA; CABRERA, 2009). De um isolado de *Penicillium* sp. de soja foi extraído um glicopeptídeo denominado AF com propriedades antimicrobianas contra

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (YANG *et al.*, 2009). A flumiquinozolina F, um alcalóide isolado de um extrato obtido a partir da fermentação do fungo *Penicillium corylophilum* em meio Czapeck, apresentou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* e *S. aureus* (SILVA *et al.*, 2004). Um isolado de ambientes extremos de *Penicillium roseopurpureum*, mesma espécie encontrada no presente trabalho, apresentou na sua cultura líquida compostos com atividade contra *S. aureus* e *Micrococcus* (CORTE *et al.*, 2000).

Um estudo publicado em 2000 avaliou a atividade antimicrobiana de metabólitos de basidiomicetos e revelou que 45% dos isolados apresentavam extratos com esta atividade (SUAY *et al.*, 2000). Alguns compostos com atividade antimicrobiana extraídos da fermentação de diferentes basidiomicetos incluem: diterpenóides (SHIONO *et al.*, 2008), *spongiporic acid A* (ZIEGENBEIN; HANSSEN; KÖNIG, 2006), dissulfidos (NICHOLAS; BLUNT; MUNRO, 2001), maletininas (ANGAWI *et al.*, 2005), ácido vulpínico (DUNCAN *et al.*, 2003).

A produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana pelo gênero *Streptomyces* é bastante conhecida e já forneceu ao mercado farmacêutico opções terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas, um exemplo disso é a kanamicina (CASTILLO *et al.*, 2003). Apesar deste gênero de actinomiceto já ter sido bastante explorado ainda é fonte de novos compostos bioativos como 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. (FGUIRA *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).

6.4 Seleção dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi para a extração dos metabólitos secundários

A análise macromorfológica foi realizada para evitar a repetição dos ensaios com microrganismos possivelmente idênticos entre si, reduzindo tempo e custos que seria gastos desnecessariamente. Esta seleção reduziu em mais de 40% os fungos a serem ensaiados. Por outro lado, manteve representantes do mesmo gênero (*Alternaria*, *Phomopsis*), bem como de gêneros diferentes. Entre os isolados do mesmo gênero, foram observados diferentes padrões de inibição de microrganismos e produção de metabólitos diferenciados.

No confronto direto dos endófitos contra o fitopatógeno *G. citricarpa*, dos gêneros fúngicos identificados, destacaram-se o basideomiceto e os gêneros *Alternaria*, *Phomopsis* e *Penicillium* como inibidores de crescimento *in vitro*. Nenhum actinomiceto estudado demonstrou controle expressivo sobre *G. citricarpa*. Estes resultados são indicativos do potencial antimicrobiano destes fungos, porém não comprovam a produção de substâncias antifúngicas, já que a inibição do fitopatógeno também pode ser resultado de uma situação de parasitismo ou simples competição por nutrientes e espaço físico. Entretanto, os resultados aqui apresentados são promissores no controle biológico deste importante fitopatógeno, e evidencia a necessidade de melhor investigação dos mecanismos de inibição existentes.

O ensaio contra *P. aeruginosa* selecionou quatro fungos filamentosos, incluindo um identificado como *Phomopsis* sp., para a extração de metabólitos secundários. Três fungos endofíticos, incluindo *Alternaria* sp. e *Penicillium roseopurpureum*, foram ativos *in vitro* contra *S. aureus*. E apenas o actinomiceto (*Streptomyces* sp.) apresentou atividade contra *C. albicans*. Os resultados sugerem uma possível síntese de substâncias antimicrobianas por estes fungos e actinomiceto que inibiram o crescimento dos patógenos.

O halo de inibição apresentado pelo *Streptomyces* sp. contra *C. albicans* é bastante superior ao do controle positivo utilizado (nistatina 100000UI/mL) e por isso merece destaque. Este actinomiceto parece produzir um interessante metabólito ativo contra levedura.

6.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos

6.5.1 Obtenção de metabólitos secundários a partir dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

A literatura apresenta diversos meios de cultura e tempos de incubação para a realização de fermentação, entretanto, algumas das condições utilizadas se mostram mais adequadas. Desde 1974, o meio MPE (item 4.1.6) é usado para a produção de antibióticos, principalmente por actinomicetos (HAMADA *et al.*, 1974). Este meio foi o mais eficiente no que diz respeito à liberação de compostos antimicrobianos em relação ao meio Sabouraud Dextrose líquido e ao meio M1 em um estudo que buscava atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos, destacando a sua importância na produção de compostos antimicrobianos (PINTO, 2003). Em 2004, Silva *et al.* investigaram qual dos meios de fermentação, entre Czapeck (item 4.1.4), Jackson e Vogel, induzia o fungo *Penicillium corylophilum* a produzir os maiores níveis de substância antimicrobiana. Dentre eles o meio Czapeck (item 4.1.4) foi o que melhor forneceu condições para a produção do metabólito ativo.

Pinto (2003) relata uma queda no potencial de atividade dos extratos quanto maior o tempo de incubação, possivelmente pela degradação do composto formado pelo próprio microrganismo. Em função disto, no presente trabalho investigou-se a atividade destes extratos também com 24 horas de incubação. Porém, sabe-se que a maioria dos metabólitos secundários só é produzida após a fase de crescimento celular exponencial (OKAFOR, 2007). Por isso, no atual estudo optou-se por fazer o cultivo também durante sete dias, a fim de garantir o máximo de produção.

Pelos resultados apresentados nos APÊNDICES 4 e 5 observa-se que o rendimento dos metabólitos excretados no meio não está diretamente relacionado com o tempo de incubação. Pois, 57,5% dos extratos produzidos apresentaram um maior rendimento com sete dias de incubação e 42,5% com apenas um dia. Esse fato é observado também independentemente do meio de cultura utilizado. A redução da quantidade de metabólitos secundários liberados no meio pode ter

ocorrido pela necessidade do microrganismo em utilizar estes compostos como fonte de nutrientes. Isso também explica porque em alguns endófitos a produção de metabólitos secundários ocorreu em um tipo de meio e não ocorreu em outro. Dentre os meios utilizados o meio MPE (item 4.1.6) foi o que melhor forneceu rendimento, pois dos 20 endófitos testados 13 excretaram mais metabólitos neste meio em relação ao meio Czapeck (item 4.1.4) (APÊNDICES 4 e 5).

Em relação ao acúmulo de metabólitos no interior de estruturas dos microrganismos 85% dos endófitos apresentaram melhor rendimento com o maior tempo de incubação. Tal fato é coerente já que com o passar do tempo um maior número de estruturas celulares foram formadas permitindo um maior armazenamento de compostos. Para os 15% que tiveram rendimento reduzido após sete dias de incubação, provavelmente tenha ocorrido a excreção dos compostos para o meio. Novamente o meio MPE (item 4.1.6) garantiu um melhor rendimento, pois dos 20 endófitos incubados 17 deles armazenaram uma maior quantidade de metabólitos quando comparado com o meio Czapeck (item 4.1.4).

A superioridade do meio MPE (item 4.1.6) em induzir a produção de uma maior quantidade de metabólitos secundários possivelmente está relacionada à riqueza de proteínas, carboidratos e lipídios na sua composição que provavelmente reduziram os esforços dos microrganismos na produção de metabólitos primários voltando suas vias metabólicas aos componentes secundários.

6.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi pelo método de bioautografia

A bioautografia revelou que os testes de seleção tanto contra *G. citricarpa* como contra a bactéria Gram-positiva e a levedura foram importantes na seleção de microrganismos produtores de metabólitos secundários ativos. Apenas os ensaios contra *P. aeruginosa* não culminaram na seleção de um microrganismo que possuísse a capacidade de produzir compostos ativos nas condições testadas. Ainda, o ensaio demonstrou a capacidade de produção de compostos bioativos nos dois meios utilizados para a fermentação e nos dois períodos de tempo pré-determinados.

Como a atividade do fungo *Phomopsis* sp. (isolado LGMF655) foi detectada apenas no extrato obtido com 24 horas de incubação e não no sétimo dia de incubação, acredita-se que ou os compostos ativos foram degradados e reutilizados pelo fungo ou novos compostos liberados interferiram nos seus sítios ativos. Nos outros casos, do isolado fúngico *Alternaria* sp. (LGMF692) e do actinomiceto *Streptomyces* sp. (LGMF696), ao contrário do anterior, os compostos ativos só foram detectados após uma semana de incubação e não com apenas um dia. Provavelmente porque este tipo de metabólito só é produzido e/ou liberado após a fase de crescimento exponencial do microrganismo. Observando os resultados posteriores, da atividade dos extratos obtidos a partir da massa celular do actinomiceto, conclui-se que estes compostos já tinham sido produzidos desde o primeiro dia de incubação e ficaram retidos, neste primeiro momento, dentro das estruturas celulares para posterior liberação no meio de cultivo.

Os extratos ativos liberados no meio líquido a partir da fermentação só foram ativos contra *S. aureus* e *C. albicans*. Parece haver uma maior dificuldade na indução da produção e liberação de substâncias ativas contra bactérias Gram-negativas já que nem os microrganismos selecionados que possuíam atividade contra *P. aeruginosa* por confronto direto tiveram a capacidade de revelar esta característica ao meio.

6.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi contra *Guignardia citricarpa*

A produção de metabólitos com maior potencial de inibição do fitopatógeno foi superior no meio MPE (item 4.1.6) e com um período de incubação para a extração dos compostos dos endófitos de sete dias, independente do tempo de exposição do extrato contra *G. citricarpa*.

As diferenças de inibição do crescimento para o mesmo extrato levando em consideração os dois tempos analisados no experimento demonstram uma instabilidade muito grande dos resultados (TABELAS 6 e 7), o que não foi observado no controle negativo. Isso pode estar relacionado a um grau de instabilidade química dos extratos obtidos, para a confirmação desta hipótese seria necessário identificar

o(s) composto(s) responsável pela inibição para tentar estabilizá-lo o que poderia resultar na seleção de um antifúngico eficiente.

Comparando os resultados obtidos no pareamento contra o fungo *G. citricarpa* (que em alguns casos ultrapassaram os 90% de inibição) com os dos extratos dos endófitos contra o fitopatógeno (que não apresentaram nenhuma inibição superior a 50% nas condições testadas) observa-se que o controle biológico por competição entre os microrganismos tem um potencial de eficiência muito maior e um custo menor do que o isolamento de um suposto composto para um posterior controle químico. Mesmo assim, os resultados mostram que há metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos endofíticos com capacidade de inibir o crescimento do fitopatógeno *G. citricarpa*. Essa propriedade pode ser aprimorada pelo isolamento e concentração do suposto composto ativo que, no caso deste trabalho, provavelmente encontra-se envolto por diversos outros compostos inativos interferindo na sua atividade. Ainda um trabalho de melhoramento das condições de cultivo para a produção da substância ativa provavelmente resultaria em percentagens maiores de inibição do fitopatógeno.

Com base nesta situação seria de grande valia na busca de alternativas para o controle da mancha-preta dos citros e de outros fitopatógenos a realização de um ensaio *in vivo* dos fungos com os melhores resultados no pareamento contra *G. citricarpa* para avaliar a atividade em campo.

6.5.4 Avaliação dos compostos extraídos dos micélios fúngicos e da massa celular do actinomiceto endofíticos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Dos extratos obtidos a partir da maceração dos micélios fúngicos dez apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos testados, o que mostra a capacidade que estes microrganismos têm em armazenar seus compostos secundários e a relevância em buscar estes metabólitos ativos dentro das hifas. Especialmente por ter sido selecionado mais extratos ativos desta maneira do que com a tentativa de fazer os endófitos liberá-los no meio e posteriormente extraí-los. As massas celulares do actinomiceto testado também

apresentaram compostos ativos, exceto a cultivada em MPE (item 4.1.6) por sete dias (TABELA 8).

É observado que os dois meios de cultivos e os dois períodos de incubação permitiram a produção e armazenamento de metabólitos ativos. Porém, destaca-se aqui a importância do uso do meio Czapeck (item 4.1.4), que foi o único, em alguns casos (*Alternaria* sp. LGMF626, *Phomopsis* sp. LGMF627, *Phomopsis* sp. LGMF694 e basideomiceto LGMF713) a permitir a produção de metabólitos ativos, mesmo estes ficando retidos nos micélios (TABELA 8). Aparentemente o meio MPE (item 4.1.6) é mais eficaz para a produção de compostos a serem liberados ao meio fermentativo, enquanto o meio Czapeck (item 4.1.4) fornece condições para a produção dos metabólitos, mas por algum motivo dificulta sua dispersão no meio.

A remoção mecânica dos metabólitos celulares de dentro de suas estruturas além de desvendar um maior número de endófitos produtores de substâncias ativas ampliou o espectro de ação dos compostos extraídos para as bactérias Gram-negativas. Aparentemente, os microrganismos armazenam estes compostos para uma possível situação de competição. Apenas o fungo *Phomopsis* sp. (LGMF655) teve todos seus compostos ativos obtidos apenas através da extração do meio de fermentação. A busca da liberação celular destas substâncias por diferentes meios fermentativos forneceria melhores condições biotecnológicas para a produção destes compostos em maior escala para seu estudo químico mais detalhado.

6.5.5 Avaliação dos compostos que permaneceram retidos no meio de cultivo após a extração com acetato de etila

Apesar de dois meios continuarem retendo os metabólitos ativos, seus extratos obtidos com acetato de etila apresentaram atividade contra o mesmo microrganismo. Isso pode indicar que houve um esgotamento do solvente fazendo com que os compostos ativos não fossem extraídos totalmente. Portanto, o acetato de etila foi eficaz na extração dos metabólitos secundários liberados pelos endófitos nos meios de cultivo.

6.6 Comparação química entre os compostos ativos do extrato metanólico bruto das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e suas frações com os compostos ativos dos endófitos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi

Os resultados das cromatografias em camada delgada revelam que há fortes evidências de que os compostos fenólicos, excluindo os do tipo cumarinas, presentes em *S. terebenthifolius* Raddi são responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta. Isto porque, estes foram encontrados tanto no extrato bruto da planta como nas duas frações ativas.

Outros autores também atribuem aos polifenóis, grupo pertencente aos compostos fenólicos, a atividade desta planta (MARSAIOLI, 1974; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY; PARDO, 2005; QUEIRES *et al.*, 2006; CERUKS *et al.*, 2007). Dentre a classe de polifenóis, os compostos já isolados da aroeira e que tiveram a atividade antimicrobiana comprovada estão: a apigenina (OHEMENG *et al.*¹; CRITCHFIELD; BUTERA; FOLKS² citados por CUSHNIE; LAMB, 2005; BASILE *et al.*, 1999; SCHINOR, 2004), o ácido elágico (MARTINI *et al.*, 2009), a naringina (TSUI; WONG; RABIE, 2008), o galato de metila (AHN *et al.*, 1998; PENNA *et al.*, 2001; AHN *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2008), a miricetrina (SHINOHARA; TABATA, 1992), a miricetina (MORI *et al.*³ citado por CUSHNIE; LAMB, 2005; CAI; WU, 1996; SHINOHARA; TABATA, 1992; XU; LEE, 2001; KANG *et al.*, 2006) e a rutina (CUSHNIE; LAMB, 2005; PEREIRA *et al.*, 2008; ORHAN *et al.*, 2009).

Trabalhos realizados com compostos fenólicos obtidos de outras fontes demonstram o efeito inibitório dos mesmos e atribuem essa característica às suas propriedades de adsorção na membrana celular, interação com enzimas, privação de íons metálicos ou de substrato (SCALBERT, 1991; MADDOX; LAUR; TIAN, 2009; KSOURI *et al.*, 2009; YALTIRAK *et al.*, 2009).

Ainda, o extrato bruto e as frações ativas da planta também apresentaram antraquinonas, gerando uma nova hipótese de que as substâncias antimicrobianas

¹ OHEMENG, K.A.; SCHWENDER, C.F.; FU, K.P.; BARRET, J.F. **DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones** (1). *Bioorg Med Chem Lett.* v.3, p.225–230, 1993.

² CRITCHFIELD, J.W.; BUTERA, S.T.; FOLKS, T.M. **Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* v.12, p.39–46, 1996.

³ MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. **Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*.** *Phytochemistry.* v.26, p.2231–2234, 1987.

associadas à aroeira possam estar vinculadas a este grupo de compostos. Outro estudo identificou as antraquinonas, além de fenóis e triterpenos, no extrato com atividade antimicrobiana da casca de *S. terebenthifolius* Raddi, porém não as observaram no extrato das folhas (LIMA *et al.*, 2006). Ao contrário dos compostos fenólicos, ainda há poucos estudos a respeito das antraquinonas presentes em *S. terebenthifolius* Raddi. As quinonas, que incluem as antraquinonas, são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis, e da mesma forma a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis, o que leva a crer que ambas as classes podem ser importantes no desenvolvimento desta atividade antimicrobiana, tanto como precursoras como detentoras da atividade (DOURADO, 2006). Entre algumas antraquinonas já conhecidas por sua atividade antimicrobiana estão a febrifuquinona e a adamabiantrona isoladas da planta *Psorospermum* (TSAFFACK *et al.*, 2009) e a monodictyquinona A isolada de um fungo marinho (EL-BEIH *et al.*, 2007).

Como para a obtenção dos extratos das folhas não foram eliminados os microrganismos endofíticos nem os epifíticos nela presentes, é possível que alguns dos compostos detectados aqui como pertencentes às folhas, principalmente os com menor intensidade de banda na cromatografia em camada delgada ou que nem foram detectados pela metodologia, podem na verdade ter sido produzido por estes microrganismos e, inclusive, podem estar envolvidos com a atividade. Porém, acredita-se que aqueles encontrados em quantidades expressivamente superiores, antraquinonas e compostos fenólicos, realmente foram produzidos pelas folhas.

Apesar da diversidade de gêneros entre os endófitos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, sugere-se, pelos resultados obtidos na cromatografia em camada delgada, que a maioria deles são produtores de alcalóides como compostos ativos. Os alcalóides são compostos heterocíclicos nitrogenados, dos alcalóides com atividade antimicrobiana mais encontrados na natureza estão os alcalóides diterpenóides (COWAN, 1999). Dos fungos produtores de alcalóides com atividade antimicrobiana foram descritos *Ascochita salicorniae* produtor da ascosalipirrolidinona A, a qual teve atividade contra *Bacillus megaterium*, *Mycotypha microsporum*, *Microbotryum violaceum*, *Plasmodium falsiparum* e *Trypanossoma cruzi* (OSTERHAGE *et al.*, 2000), *Aspergillus fumigatus* que produz a fumigaclavina C, o asperfumóide, a fumitremorgina C, que são compostos com atividade contra *C. albicans* (LIU *et al.*, 2004). Já foram isolados fungos marinhos

produtores de alcalóides com atividade antimicrobiana (ZHANG *et al.*, 2009). Já citada no item 6.4 deste trabalho, a flumiquinozolina F, um alcalóide isolado de *Penicillium corylophilum*, em meio Czapeck (item 4.1.4), apresentou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* e *S. aureus* (SILVA *et al.*, 2004). Apesar de existirem alcalóides com atividade antimicrobiana estes compostos estão muito mais relacionados com a atividade antitumoral e antiinflamatória o que desperta o interesse em se desenvolver uma bioprospecção dos extratos de endófitos obtidos.

Outras classes de compostos também foram reveladas nos extratos dos endófitos, porém com menor frequência em relação aos alcalóides. Dois endófitos, um isolado de *Alternaria* sp. e um de *Streptomyces* sp., produziram antraquinonas e um isolado de *Phomopsis* sp. foi produtor de terpenóides. Há relatos de endófitos produtores destas duas classes de substâncias com atividade antimicrobiana, as periconicinas são diterpenos com atividade antimicrobiana isoladas do fungo *Periconia* sp., sendo que entre elas destaca-se a pericocina A que exibe uma atividade significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium* (KIM *et al.*, 2004), o guanacasterpeno I ativo contra *S. aureus* também foi isolado de um fungo endofítico (BRADY; BONDI; CLARDY, 2001), o *physcion* é uma antraquinona produzida pelo *Aspergillus fumigatus* com atividade contra *C. albicans* (LIU *et al.*, 2004), o ácido torreianico é uma quinona com atividade antimicrobiana e anticancerígena isolada de *Pestalotiopsis microspora* (LEE *et al.*¹ citado por STROBEL, 2002).

Com esta visão dos resultados obtidos acredita-se que não há uma relação direta entre os metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzidos pela planta com aqueles produzidos pelos endófitos estudados, já que nenhum dos perfis químicos analisados dos endófitos demonstrou a presença de compostos fenólicos. Este fato demonstra a grande diversidade de metabólitos secundários presentes na natureza e a importância de se buscar substâncias ativas tanto em plantas medicinais como em seus endófitos.

¹ LEE, J.; YANG, X.; SCHWARTZ, M.; STROBEL, G.A.; CLARDY, J. **The relationship between the rarest tree in North America and an endophytic fungus.** Chem. Biol. v. 2, p. 721–727, 1995.

7 CONCLUSÕES

★ O extrato bruto metanólico das folhas de aroeira apresenta alto potencial para bioprospecção, possuindo atividade antimicrobiana de amplo espectro, incluindo inibição no crescimento do fitopatógeno *Guignardia citricarpa*.

★ As frações do extrato metanólico bruto das folhas com maior atividade antimicrobiana são a de diclorometano:acetato de etila (1:1) e a de acetato de etila.

★ A análise química por cromatografia em camada delgada demonstra que tanto o extrato bruto das folhas como as frações ativas apresentam compostos fenólicos e antraquinonas.

★ Foram identificados como endófitos das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium roseopurpureum*, *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp. e *Trichaptum* sp. Foi também identificado um isolado de actinomiceto pertencente ao gênero *Streptomyces*.

★ Os endófitos isolados das folhas de *S. terebenthifolius* Raddi apresentam potencial para bioprospecção, sendo que 19 fungos e um actinomiceto apresentaram inibição do crescimento de pelo menos um dos microrganismos testados.

★ Os extratos obtidos dos isolados endofíticos são constituídos principalmente por alcalóides.

★ Foram obtidos extratos fúngicos com potencial no controle do fitopatógeno *Guignardia citricarpa*, e devem ser melhor investigados.

★ Nas condições testadas, os extratos das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi com atividade antimicrobiana não foram quimicamente relacionados com os extratos obtidos dos endófitos desta mesma planta.

PERSPECTIVAS FUTURAS:

- Realizar o isolamento e identificação das bactérias endofíticas das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi e avaliar seu potencial de atividade antimicrobiana, incluindo os actinomicetos, pela baixa amostragem neste estudo;

- Aprimorar as condições de fermentação dos endófitos identificados como produtores de atividade antimicrobiana para a obtenção de um maior rendimento dos extratos ativos, permitindo a realização de mais ensaios químicos e de atividade;
- Se possível, 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 apresentaram bons resultados no ensaio do pareamento contra o fitopatógeno *Guignardia citricarpa*, estudar o mecanismo de ação para verificar a possibilidade do uso como controle biológico;
- Para os endófitos que apresentaram bons resultados no ensaio do pareamento contra o fitopatógeno verificar também a possibilidade de produção de compostos voláteis, os quais podem ser úteis no controle da doença de frutos confinados;
- Aprimorar, por purificação, os extratos com atividade contra o fitopatógeno para um possível uso como antifúngico.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AHN, Y.J.; LEE, C.O.; KWEON, J.H.; AHN, J.W.; PARK, J.H. **Growth-inhibitory effects of *Galla Rhois* - derived tannins on intestinal bacteria**. Journal of Applied Microbiology v.84, p.439–443, 1998.
- AHN, Y.J.; LEE, C.O.; OH, H.S.; KIM, H.T.; LEE, Y.H. **Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois* - derived phenolics against phytopathogenic fungi**. Pesticide Biochemistry and Physiology. v.81(2), p. 105-112, 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHAHG, J.; ZHAHG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- AMORIM, M.M.R. de; SANTOS, L.C.. **Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado**. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., v. 25, nº.2, 2003.
- ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. B. Ceppa Curitiba, v.24, n.2, pág. 319-336, 2006.
- ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, pág. 179-197, 1991.
- ANGAWI, R.F.; SWENSON, D.C.; GLOER, J.B.; WICKLOW, D.T. **Malettinins B-D: New Polyketide Metabolites from an Unidentified Fungal Colonist of *Hypoxylon Stromata* (NRRL 29110)**. J. Nat. Prod. v. 68, pág. 212-216, 2005.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. **Compostos Fenólicos em Alimentos – uma breve revisão**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.66(1), p. 232-240, 2007.
- ARAÚJO, W.L., LIMA, A.O.S., AZEVEDO, J.L., MARCON, J., SOBRAL, J.K., LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, 2002.

AZEVEDO, J.L. *et al.* **Coleção de Culturas do CBA (Centro de Biotecnologia da Amazônia)**. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/cba/downloads/4_microbiologia.pdf>. Acesso em: outubro de 2008.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial endophytes**. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. 2000.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. **Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility**. S.S. Gnanamanickam (ed.), *Plant-Associated Bacteria*, pág. 155–194, 2006.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. **Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi**. *Quím. Nova*, v. 30, nº. 8, pág. 1959-1965, 2007.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; LOPEZ-SAEZ, J.A.; COBIANCHI, R.C. **Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses**. *Phytochemistry*. v. 52, pág.1479–82, 1999.

BELL, C.R. *et al.* **Endophytic bacteria in grapevine**. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, pág. 46-53, 1995.

BERGER, S., SINHA, A.K., ROITSCH, T.. **Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions**. *Journal of Experimental Botany*. v. 58, n. 15-16, pág. 4019-1026, 2007.

BERTINETTI, B.V.; PEÑA, N.I.; CABRERA, G.M. **An Antifungal Tetrapeptide from the Culture of *Penicillium canescens***. *Chemistry and Biodiversity*. v.6, pág, 1178-1184, 2009.

BIZI, R.M. **Microrganismos endofíticos**. Disciplina de "Controle Biológico Florestal, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Silvicultura, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná", ministrada pelo Prof. Dr. Nilton José Sousa. 2008.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do Sítio**. Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Capturado em: 24/jan./2002.

BOROS, L.F. **Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira)**. Tese de Mestrado (Microbiologia, Parasitologia e Patologia) do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, 2007.

BRADY, S.F.; BONDI, S.M.; CLARDY, J. **The Guanacastepenes: A Highly Diverse Family of Secondary Metabolites Produced by an Endophytic Fungus**. Journal of American Chemical Society. v.123, p. 9900-9901, 2001.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G. AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. **Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos**. Acta Cir. Brás. Suppl., v.2, pág.15-20, 2006.

CAI, L., WU, C.D. **Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens**. Journal of Natural Products. v. 59, p.987-990, 1996.

CALVO, A.M., WILSON, R.A., BOK, J.W., KELLER, N.P. **Relationship between secondary metabolism and fungal development**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 66, nº 3, p. 447-459, 2002.

CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; PAOLI, A.A.S.. **Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*) em desenvolvimento**. Revista Brasileira de Botânica v. 22, nº1, pág. 91-98, 1999.

CASTILLO, 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.

CERUKS, M. *et al.* **Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*)**. Química Nova. v. 30, nº3, pág. 507-599, 2007.

CHOI, J.G.; OK, H.K.; YOUNG, S.L.; YOU, C.O.; HEE, S.C.; HYE, J.J.; JONG, H.K.; DONG, H.S.; DONG, W.S.; HYUN, P.; DONG, Y.K. **In Vitro Activity of Methyl Gallate Isolated from *Galla Rhois* Alone and in Combination with Ciprofloxacin Against Clinical Isolates of *Salmonella***. Journal of Microbiology and Biotechnology. v.18(11), p. 1848-1852, 2008.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. **Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp.** J. Basic Microbiol. v. 44(2), pág. 157-160, 2004.

CORREA, A.S. **Avaliação da microbiota endofítica de citrus com potencial antagonico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CORTE, A.M.; LIOTTA, M.; VENTURI, C.B.; CALEGARI, L. **Antibacterial activity of *Penicillium* spp. strains isolated in extreme environments.** Polar Biol. v.23, pág. 294-297, 2000.

COTA, B.B. *et al.* **Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*.** FEMS Microbiol Lett, v. 285, pág. 177–182, 2008.

COWAN, M.M. **Plant Products as Antimicrobial Agents.** Clinical Microbiology Reviews. v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. **Antimicrobial activity of flavonoids.** Int J Antimicrob Agents. Nov; v.26(5), p.343-356, 2005.

CVETNIC, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. **Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract.** Acta Pharmaceutica. v.54(3), p.243-50, 2004.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J.. **Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi).** Visão Acadêmica, v. 5, nº 2, pág. 83-90, 2004.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PARDO, M.R.M.. **Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi.** Ciênc. agrotec., v. 29, n.3, pág.617-622, 2005.

DE HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. **Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes.** Mycoses, v.41, p. 183-189, 1998.

DOURADO, R.S. **Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae).**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2006.

DRUMOND, M.R.S. *et al.* **Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas.** Pesq. Brás. Odontoped. Clin. Integr., v. 4, n. 1, p. 33-38, 2004.

DU, X.; LU, C.; LI, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. **Three new antimicrobial metabolites of *Phomopsis* sp.** The Journal of Antibiotics. v. 61(4), pág. 250-253, 2008.

DUNCAN, C.J.G.; CUENDET, M.; FRONCZEK, F.R.; PEZZUTO, J.M.; MEHTA, R.G.; HAMANN, M.T.; ROSS, S.A. **Chemical and Biological Investigation of the Fungus *Pulveroboletus ravenelii*.** J. Nat. Prod. v.66, pág.103-107, 2003.

EL-BEIH, A.A.; KAWABATA, T.; KOIMARU, K; OHTA, T.; TSUKAMOTO, S. **Monodictyquinone A: a New Antimicrobial Anthraquinone from a Sea Urchin-Derived Fungus *Monodictys* sp.** Chem. Pharm. Bull. v. 55(7), p.1097—1098, 2007.

ELVIRA-RECUENCO, M,; VAN VUURDE, J.W.L. **Natural incidente of endophytic bacteria in pea cultivars under fields conditions.** Canadian Journal of Microbiology, v.46, pág. 1036-1041, 2000.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Edusc, 510p, 2004.

FENNER, R. *et al.* **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica.** Rev. Brás. Cienc. Farm. v. 42, nº3, pág. 369-394, 2006.

FERRO, E.A.; ALVARENGA, N.C. **Evaluacion de la actividad antimicrobiana de *Aristolochia giberti* (patito).** Revista de Ciencia y Tecnologia, v. 1, nº 2, pág.71-77, 2000.

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.

FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.** Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo. 2004.

FISCHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: fundamentos e diagnóstico.** Editora Revinter: Rio de Janeiro, 2001

FRANCISCO DE A.S. e SILVA. **ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008)** - Homepage <http://www.assistat.com> DEAG-CTRN-UFCG – Atualizada 01/12/2009

FRISVAD, J.C., ANDERSEN, B., THRANE, U.. **The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi.** Mycological Research, v. 112, pág. 231-240, 2008.

FUCHS, F.D. e WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional.** Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2ªed., 1998.

GAGNE, D.; PONS, M.; PHILIBERT, D. **RU 38486: a potent anti-glucocorticoid in vitro and in vivo.** Journal of Steroid Biochemistry, v. 23, pág. 247, 1985.

GAO, X.X. *et al.* **High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach.** FEMS Microbiology Letters, v. 249, pág. 255–266, 2005.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. **Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*.** Genetic and Molecular Biology, v. 25, n.2, p.251-255, 2002.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. **Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do Estado de São Paulo.** Fitopatologia Brasileira v.15, p.73-75. 1993.

GONZALES, B.; LECHUGA, C.A.M. e SERRANO, F.C.A.. **Estúdio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (*Yawar Chonq'a*).** Rev. Situa, v.9, n.17, p.66-66, 2001.

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; SINGH, M.; RAO, C.H.V.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.; PUSHANGADAN, P. **Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia***. Journal of Ethnopharmacology. Jun 15; v.106(1), p.57-61, 2006.

GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCABA, Y. **Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebenthifolius* Raddi (copal)**. Rev. Cubana Plant. Med., v.5, n.1, p.23-25, 2000.

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, n. 9, pág. 976-985, 2002.

GUROVIC, M.S.V.; MARRAY, A.P.; FERRERO, A.A. **Essential oil from fruits and leaves of *Schinus aroeira* L. with acetylcholinesterase inhibitory activity**. Planta Med., v. 73, 2007.

HALL, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em:<<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 2005.

HALLMANN, J. *et al.* **Bacterial endophytes in agricultural crops**. Canadian Journal of Microbiology, v.43, pág. 895-914,1997.

HAMADA, M.; KONDO, S.; YOKOYAMA, T.; MIURA, K.; IINUMA, K.; YAMAMOTO, H.; MAEDA, K.; TAKEUCHI, T.; UMEZAVA, H.. **Minosaminomycin, a new antibiotic containing myo-inosamine**. The Journal of Antibiotics, v.27, n.1, pág. 81-83, 1974.

HARBORNE, J.B.. **Phytochemical methods**. A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd ed. London. Chapman & Hall. 1998.

HARRISON, L. *et al.* **Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity**. J. Gen. Microbiol. v.137, n.12, pág. 2857-2865, 1991.

HOFFMAN, I. *et al.* **Efeito do extrato hidroalcoólico da Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas**. Estudo experimental em ratos. Acta Cir. Bras. v.21, nº3, pág. 49-54, 2006.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. **Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76**. *Phytochemistry*. v.69, pág. 1604–1608, 2008.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; RESENDE, M.A. **Atividade antifúngica de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra fungos de relevância clínica**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, n.4, pág.632-637, 2007.

JORGE, L.I.F.; MARKMANN, B.E.O.. **Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. *Rev. Ciênc. Farm.* v. 17, pág. 139-145, 1996.

KANG, M.S.; OH, J.S.; KANG, I.C.; HONG, S.J.; CHOI, C.H. **Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria**. *Journal of Microbiology*. v.46(6), p. 744-750, 2008.

KANG, S.S.; KIM, J.G.; LEE, T.H.; OH, K.B. **Flavonols Inhibit Sortases and Sortase-Mediated *Staphylococcus aureus* Clumping to Fibrinogen**. *Biol. Pharm. Bull.* v.29(8), p.1751—1755, 2006.

KIM, S.; SHIN, D.S.; LEE, T.; OH, K.B. **Periconicins, Two New Fusicoccane Diterpenes Produced by an Endophytic Fungus *Periconia* sp. with Antibacterial Activity**. *Journal of Natural Products*. v. 67(3), p. 448-450, 2004.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. **Xanalteric Acids I and II and Related Phenolic Compounds from an Endophytic *Alternaria* sp. Isolated from the Mangrove Plant *Sonneratia alba***. *Journal of Natural Products*. v.72, pág. 2053-2057, 2009.

KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. **Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture**. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. 2000.

KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KSOURI, R.; FALLEH, H.; MEGDICHE, W.; TRABELSI, N.; MHAMDI, B.; CHAIEB, K.; BAKROUF, A.; MAGNÉ, C.; ABDELLY, C. **Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents.** Food and Chemical Toxicology. v.47, pág. 2083-2091, 2009.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. **Selection of media for isolation of streptomycetes.** Nature, v. 202, p. 928-929, 1964.

LARONE, D.H. **Medically important fungi: a guide to identification.** Editora Elsevier: Nova Iorque. 2ª ed., 1993.

LENZI, M.; ORTH, A.I. **Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebenthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil.** Biotemas, v.17, n.2, pág. 67-89, 2004.

LI, H.Y. *et al.* **Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.21, pág. 1515–1519, 2005.

LI, H.Y. *et al.* **Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.21, pág.553–558, 2005.

LIMA, E.O.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L. ***Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso.** Infarma, v.16, n.7, pág. 83-85, 2004.

LIMA, J.S. **Diversidade genética e RNAdf de isolados de *Colletotrichum* ssp. endofíticos da planta medicinal *Schinus terebenthifolius* Raddi.** Dissertação de Mestrado do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, 2008.

LIMA, M.R.F. *et al.* **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology. v. 105, nº 1-2, pág. 137-147, 2006.

LIN, R.D.; CHIN, Y.P.; LEE, M.H. **Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*.** Phytotherapy Research. v.19(7), p. 612-617, 2005.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. **Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 23, pág. 1037-1040, 2007.

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.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. ***Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites.** Journal of Biotechnology. v.114(3), p. 279-287, 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 4ªed. Ed. Instituto Plantarum. v. 1, pág. 24, 2002.

MADDOX, C.E.; LAUR, L.M.; TIAN, L. **Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*.** Current Microbiology. 2009.

Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (antigo NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico;** Norma Aprovada — Sexta Edição, M7A6, v23 n2, 2003.

Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (antigo NCCLS). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão;** Norma Aprovada — Oitava Edição, M2-A8, v23, n1, 2003.

MARIANO, R. L. R. **Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas.** Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. I, p. 369-409, 1993.

MARSAIOLI, A.J. **Estudo fitoquímico do *Schinus terebentifolius* Raddi.** Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Campinas. Dissertação de Mestrado, 1974.

MARTIN, J.F.; DEMAIN, A.L. **Control of antibiotic biosynthesis.** Microbiological Reviews. v.44 (2), pág. 230-251, 1980.

MARTINES, M.J.; ALONSO, N.G.; BETANCOURT, J.B.. **Actividad antimicrobiana del *Schinus terebentifolius* Raddi (copal)**. Rev. cuba. plantas med; v.1, nº3, pág. 37-39, 1996.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI, C. **Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds**. Int J Antimicrob Agents. Jul; v.34(1), p.50-9, 2009.

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.

MATIELLO, R.R. *et al.* **Resistência das plantas a moléstias fúngicas**. Ciência Rural, v.27, n.1, pág. 161-168, 1997.

MCKAY, D.L.; BLUMBERG, JB. **A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.)**. Phytother Res. Jul;20(7):519-30, 2006.

MELO, F.M.P. **Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MA11M4a**. Dissertação para o título de Mestre em Agronomia da Universidade de São Paulo, 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Editora EMBRAPA, Jaguariúna-SP. pág. 117-137, 1998.

MERK, E. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel**. Darmstadt, Alemanha, 1972.

MILLER, C.M. *et al.* **Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava***. Journal of Applied Microbiology, v.84, pág. 937–944, 1998.

MONCIARDINI, P., SOSIO, M., CAVALETTI, L., CHIOCCHINI, C., DONADIO, S. **New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes**. FEMS Microbiology Ecology. v.42, pág. 419-429, 2002.

MORGAN, E.C.; OVERHOLT, W.A.. **Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Anacardiaceae*) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants.** The Journal of the Torrey Botanical Society, v. 132, nº1, pág. 11-15, 2005.

MOTA, B.C.F.; SOUZA, L.M.; MERCADANTES-SIMÕES, M.O.; FERNANDES, M.F.G; SANTOS, H.C.M. **Atividade Antifúngica e Antibacteriana de Metabólitos Secundários de Plantas.** III Fórum gestão, pesquisa, ensino, extensão da Universidade Estadual de Montes Claros. 23-25 de setembro de 2009.

M'PIGA, P. *et al.* **Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-licopersici in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 50, pág. 301-320, 1997.

MURRAY, A.P. *et al.* **Gas chromatography-mass spectrometry study of the essential oils of *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg., *Schinus fasciculata* (Griseb.) I. M. Johnst., and *Schinus areira* L..** Z. Naturforsch. v. 60, pág. 25-29, 2005.

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(1), pág. 35-39, 2008.

NICHOLAS, G.M.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G. **Cortamidine Oxide, a Novel Disulfide Metabolite from the New Zealand Basidiomycete (Mushroom) *Cortinarius* Species.** J. Nat. Prod. v.64, pág. 341-344, 2001.

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.

NUNES, J.R. *et al.* **Evaluation of the hydro-alcoholic *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) extract in the healing process of the alba linea in rats.** Acta Cir. Bras., v. 21, nº3, pág. 8-15, 2008.

OEHRLE, N.W. *et al.* **Enhanced attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean through reduced root colonization of internally seedborne microorganisms.** Canadian Journal of Microbiology, v. 46, pág. 600-606, 2000.

OKAFOR, N. **Modern industrial microbiology and biotechnology.** Science Publishers, Enfield, NH, USA. Cap. 5 e 9. 2007.

OMI, SHIGERU. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em: http://www.wpro.who.int/media_centre/press_releases/pr_20050609.htm. Acesso em: 14 de dezembro de 2009.

ORDÓÑEZ, V.P.; VEJA, E.M. e MELAGÓN, A.O.. **Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province**. *Lyonia*. v.10, n.2, p. 6-71, 2006.

ORHAN, D.D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. **Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids**. *Microbiological Research*. 2009.

OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KONIG, G.M.; WRIGHT, A.D. **Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae***. *The Journal of Organic Chemistry*. v. 65(20), p. 6412-6417, 2000.

PALÍKOVÁ, I.; HEINRICH, J.; BEDNÁR, P.; MARHOL, P.; KREN, V.; CVAK, L.; VALENTOVÁ, K.; RUZICKA, F.; HOLÁ, V.; KOLÁR, M.; SIMÁNEK, V.; ULRICHOVÁ, J. **Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: a novel source for phenolic antioxidants**. *J Agric Food Chem*. Dec 24; v.56(24), p. 11883-9, 2008.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. CAB International, 125 p., 1994.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. **Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active Compounds from *Sebastiania brasiliensis***. *Journal of Ethnopharmacology*. v.77, p.37-40, 2001.

PEPELJNJAK, S.; KALODERA, Z.; ZOVKO, M. **Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit.** *Acta Pharmaceutica*, v.55, p.431-435, 2005.

PEREIRA, A.C.; OLIVEIRA, D.F.; SILVA, G.H.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CAVALHEIRO, A.J.; CARVALHO, D.A.; SOUZA, L.P.; CALFOUN, S.M. **Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae)**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v.80, n.3, p.427-432, 2008.

PEREIRA, A.P.; FERREIRA, I.C.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. **Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves.** *Molecules*, May 26;12(5):1153-62; 2007.

PHONGPAICHT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. **Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* v.48, pág. 367-372, 2006.

PINTO, L.D. **Atividade Antimicrobiana e Caracterização Molecular de Microrganismos Endofíticos Isolados de Folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco).** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

PLANTAS QUE CURAM. Disponível em: <<http://celtic.bighost.com.br/>>. Acesso em: 01/05/2008.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. **Control of *Rhizoctnia solani* and *Sclerotium rolfsii* in greenhouse using endophytic *Bacillus* spp.** *European Journal of Plant Pathology*, v.101, pág. 665-672, 1995.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. **Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species.** *Canadian Journal of Microbiology*, v.42, pág. 1144-1154, 1996.

QUEIRES, L.C.S; RODRIGUES, L.E.A. **Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi).** *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 41, n.2, pág. 247-53, 1998.

QUEIRES, L.C. *et al.* **Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells.** *Anticancer Research*, v.26, nº1A, pág. 379-387, 2006.

RAHALISON, L., HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K., MONOD, M. e FRENK, E. **Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants.** *Phytochem. Anal.*, v.2, 199–203, 1991.

RAMESH, N.; VISWANATHAN, M.B.; SARASWATHY, A.; BALAKRISHNA, K.; BRINDHA, P.; LAKSHMANAPERUMALASMY, P. **Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*.** *Fitoterapia.* v. 72(8), p. 934-936, 2001.

RAMIREZ, L.S.; DIAZ, H.E. **Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo**. Scientia et Technica, v.13, nº 33, pág. 397-400, 2007.

REICHLING, J.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; SCHNITZLER, P. **Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpesvirus infectivity in cell culture**. Forsch Komplementmed. Dec; v.15(6), p.313-20, 2008.

REINHOLD, B.; HUREK, T. **Location of diazotrophs in the interior with special attention to the kallar grass association**. Plant and Soil, v.110, pág. 259-268, 1988.

REITER, B. *et al.* **Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica***. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, pág. 2261-2268, 2002.

RIBAS, M.O. *et al.* **Efeito da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato**. Rev. Odonto Cienc. – Fac. Odonto/PUCRS, v.21, nº 53, pág. 245-252, 2006.

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

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S. e FERREIRA, F.A.. **Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias**. Planta Daninha. v.27, n.3, p.507-513, 2009.

RYAN, R.P. *et al.* **Bacterial endophytes: recent developments and applications**. Federation of European Microbiological Societies, v. 278, pág. 1-9, 2008.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. **Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants**. Annual Review of Ecology and Systematics. v. 29, pág. 319-343, 1998.

SALGADO, R. *et al.* **Actividad biocida de extractos vegetales de espécies etnobotânicas de la región centro-occidente de México**. Revista Cubana Plantas Medicinales, v. 10, edição especial; pôster, 2005.

SÁNCHEZ PERERA, L.M.; VARCALCEL, L.; ESCOBAR, A.; NOA, M. **Polyphenol and phytosterol composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. bark.** J Herb Pharmacother. v.7(3-4), p.107-28, 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, Washington, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A.C.A. *et al.* **Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi.** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, nº2, pág.1011-1013, 2007.

SANTOS, O.J. *et al.* **Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos.** Acta Cir. Bras. v.21, nº.2, pág. 39-45, 2006.

SAXENA, G.; McCUTCHEON, A.R.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.; HANCOCK, R.E. **Antimicrobial Constituents of *Rhus glabra*.** Journal of Ethnopharmacology. v.42(2), p. 95-99, 1994.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins.** Phytochemistry, v.12, pág. 3875–3883, 1991.

SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE, S. de; DIAS, D.A. **Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*.** Phytomedicine, v. 11, p.224-229, 2004.

SCHMOURLO, G., MENDONÇA-FILHO, R.R., ALVIANO, C.S., COSTA, S.S. **Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants.** Journal of Ethnopharmacology. v.96, nº 3, pág. 563-568, 2005.

SCRIVANTI, L.R., ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.. ***Tagetes minuta* and *Schinus aroeira* essential oils as allelopathic agents.** Biochemical Systematics and Ecology, v. 31, nº6, pág. 563-572, 2003.

SETTE, L.D. *et al.* **Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants.** World J Microbiol Biotechnol, v.22, pág.1185–1195, 2006.

SHINOHARA, H.; TABATA, T. **On The Antimicrobial Activity of Myricitrin and Myricetin extracted from *Myrica rubra***. Higashikyushu Junior College. Jan, 18, p.113-116, 1992.

SHIONO, Y.; HIRAMATSU, F.; MURAYAMA, T.; KOSEKI, T.; FUNAKOSHI, T. **Two Cyathane-Type Diterpenoids from the Liquid Culture of *Strobilurus tenacellus***. Chemistry and Biodiversity. v. 5, pág. 1811-1816, 2008.

SILVA, G.S., FURTADO, N.A.J.C., PUPO, M.T., FONSECA, M.J.V., SAID, S., DA SILVA FILHO, A.A., BASTOS, J.K. **Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx**. Microbiological Research, v159, pág. 317-322, 2004.

SOARES, D.G.S. *et al.* **Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas de fitoterápicos**. Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS, v. 21, n. 53, pág. 232-238, 2006.

SOARES, D.G.S. *et al.* **Atividade Antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans***. Pesq. Brás. Odontoped. Clin. Integr., v. 7, nº3, pág. 253-257, 2007.

SOE, W.M.; TZER, P.L.R.; CHU, S.L.L.; SAKHARKAR, K.R.; SAKHARKAR, M.K. ***In vitro* drug interactions of gallates with antibiotics in *Staphylococcus aureus***. Frontiers in Bioscience. v.2, p. 668-672, 2010.

SONG, Y.C. *et al.* **Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths**. FEMS Microbiology Letters, v. 241. pág. 67–72, 2004.

SOUZA, A.; FERREIRA, I.C.; CALHELHA, R.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. **Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'**. Bioorg Med Chem. Dec 15;14(24):8533-8, 2006.

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

SOUZA, C.S. *et al.* **Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 12, pág. 1759-1766, 2006.

STASI, L.C.; LIMA, C.A.H. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ªed. Ed. UNESP: São Paulo, pág. 344, 350 e 360, 2002.

STRAPASSON, M.; SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S. **Fungos associados às sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*)**. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n. 45, pág. 131-135, 2002.

STRINGARI, D. **Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. nos Estados do Paraná e São Paulo**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná. 2009.

STROBEL, G.A. **Rainforest Endophytes and Bioactive Products**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 22(4), p.315–333, 2002.

STURZ, A. *et al.* **Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth**. Biology and Fertility Soils, v. 25, pág. 13-19, 1997.

SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F.J.; BASILIO, A.; CABELLO, M.A.; DÍEZ, M.T.; GARCÍA, J.B.; DEL VAL, A.G.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M.F. **Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities**. Antonie van Leeuwenhoek. v.78, pág. 129-139, 2000.

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.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599, 2006.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, Austrália. **Identification Keys**. Acesso em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/Keys/Key%20to%20Medically%20Important%20Conidial%20Moulds.html>. Disponível em dezembro de 2009.

TIMMER, L. W.; DUNCAN, L.W. **Citrus Health Management**. Saint Paul. APS Press. p.107-115, 1999.

TSAFFACK, M.; NGUEMEVING, J.R.; KUETE, V.; TCHIZE, B.L.S.N.; MKOUNGA, P.; BENG, V.P.; HULTIN, P.G.; TSAMO, E.; NKENGFACK, A.E. **Two New Antimicrobial Dimeric Compounds: Febrifuquinone, a Vismione-Anthraquinone Coupled Pigment and Adamabianthrone, from two *Psorospermum* Species.** Chem. Pharm. Bull, v.57(10), p.1113—1118, 2009.

TSUI, V.W.; WONG, R.W.; RABIE, A.B. **The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens *in vitro*.** Phytotherapy Research. Mar; v.22(3), p.401-406, 2008.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* **Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts.** Fitoterapia, v.74, pág. 91-97, 2003.

XU, H.X.; LEE, S.F. **Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant Bacteria.** Phytotherapy Research. v.15 (1), p. 39-43, 2001.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Caracterização morfológica, molecular e estruturação populacional de *Colletotrichum acutatum*.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, 2009.

WANG, F.W. *et al.* ***Neoplaether*, a new cytotoxic and antifungal endophyte metabolite from *Neoplaconema napellum* IFB-E016.** FEMS Microbiol Lett, v. 261, pág. 218–223, 2006.

WANG, F.W. *et al.* **Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp.** World J Microbiol Biotechnol, v. 23, pág. 79–83, 2007.

WANG, F.W. *et al.* **Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*.** World J Microbiol Biotechnol, v. 24, pág. 2143–2147, 2008.

WANG, J. *et al.* **Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*.** FEMS Microbiology Letters, v.193, pág. 249-253, 2000.

WANNAZ, E.D.; ZYGADLO, J.A.; PIGNATA, M.L.. **Air pollutants effect on monoterpenes composition and foliar chemical parameters in *Schinus aroeira* L.** The Science of The Total Environment, v. 15, pág. 177-193, 2003.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.** Editora CRC: Nova Iorque. 2ªed., 2002.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** Editora Churchill Livingstone: Londres. Pág. 285-286. 1999.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. **Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*.** Mycologia, Lawrence, v.82, p.218-226, 1990.

WIYAKRUTTA, S. *et al.* **Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.20, pág. 265–272, 2004.

YBARRA, F. *et al.* **Influencia de la época de recolección de *Minthostachy verticillata* (Argentina) sobre la actividad antimicrobiana de su aceite esencial.** v. 10 edición especial; pôster, 2005.

YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. **Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr.** Food and Chemical Toxicology, v. 47, pág. 2052-2056, 2009;

YANG, C.; CROWLEY, D.E.; MENGE, J.A. **16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots.** FEMS Microbiology Ecology, v.35, pág. 129-136, 2001.

YANG, W.H.; ZHANG, W.C.; LU, X.M.; JIANG, G.S.; GAO, P.J. **Characterization of a novel antibacterial glycopeptide produced by *Penicillium* sp. M03.** Letters in Applied Microbiology. v. 48, pág. 393-397, 2009.

YOU, C.B. *et al.* **Attachment of alcaligenes to rice roots.** Soil Biology and Biochemistry, v.27, pág. 463-466, 1995.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.J.; WANG, Y.; MA, L.F.; ZHU, Y.H. **Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy.** Marine Drugs. v.7, p. 97-112, 2009.

ZIEGENBEIN, F.C.; HANSSEN, H.P.; KÖNIG, W.A. **Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus***. *Phytochemistry*. v.67, pág. 202–211, 2006.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PAREAMENTO DOS ENDÓFITOS CONTRA *Guignardia citricarpa*

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	54	10.51622	0.19474	11.0309 **
Resíduo	220	3.88400	0.01765	
Total		274	14.40022	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 54, 220 F-krit(1%) = 1.5995 F = 11.0309 $p < .00100$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Tratamento	Média	Letras
1	0.62000	abcde
2	0.24000	fghim
3	0.10000	m
4	0.42000	bcdefghil
5	0.04000	m
6	0.16000	him
7	0.32000	efghim
8	0.20000	fghim
9	0.42000	bcdefghil
10	0.70000	abc
11	0.50000	bcdefgh
12	0.54000	abcdef
13	0.18000	ghim
14	0.14000	im
15	0.24000	fghim
16	0.24000	fghim
17	0.08000	m
18	0.04000	m
19	0.10000	m
20	0.04000	m
21	0.46000	bcdefghi
22	0.44000	bcdefghij
23	0.38000	bcdefghim
24	0.20000	fghim
25	0.46000	bcdefghi
26	0.34000	defghim
27	0.36000	cdefghim
28	0.12000	im
29	0.30000	efghim
30	0.38000	bcdefghim
31	0.68000	abcd
32	0.46000	bcdefghi
33	0.24000	fghim
34	0.28000	efghim

continua

APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PAREAMENTO DOS ENDÓFITOS
CONTRA *Guignardia citricarpa* **continuação**

35	0.14000	im
36	0.34000	defghim
37	0.16000	him
38	0.40000	bcdefghil
39	0.52000	bcdefg
40	0.36000	cdefghim
41	0.88000	a
42	0.72000	ab
43	0.16000	him
44	0.14000	im
45	0.14000	im
46	0.46000	bcdefghi
47	0.42000	bcdefghil
48	0.20000	fghim
49	0.46000	bcdefghi
50	0.14000	im
51	0.12000	im
52	0.04000	m
53	0.52000	bcdefg
54	0.54000	abcdef
55	0.46000	bcdefghi

DMS = 0.34392
MG = 0.32255 CV% = 41.19432

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O número 1 (marcado em verde) representa o controle de crescimento de *G. citricarpa* e os dados marcados em amarelo representam os endófitos que apresentaram uma inibição maior do que 50% no crescimento do fitopatógeno, todos eles apresentam diferença estatística em relação ao controle (número 1) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2010)

APÊNDICE 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA *Guignardia citricarpa* COM 7 DIAS DE
CULTIVO

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46		12.97873	0.28215	8.6472 **
Resíduo	110		3.58917	0.03263	
Total	156		16.56790		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 46, 110 F-krit(1%) = 1.7382 F = 8.6472 $p < .00100$

MÉDIAS E MEDIDAS
Médias de tratamento

1 1.94000 abc **continua**

APÊNDICE 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA *Guignardia citricarpa* COM 7 DIAS DE
CULTIVO **continuação**

2	1.68000	abcdef
3	1.92000	abc
4	2.04000	ab
5	1.66000	abcdef
6	1.60000	bcdef
7	1.87500	abcd
8	1.98000	abc
9	1.86667	abcd
10	2.27500	a
11	1.76000	abcd
12	1.70000	abcdef
13	1.45000	bcdef
14	1.60000	bcdef
15	1.48000	bcdef
16	1.52000	bcdef
17	1.05000	f
18	1.40000	cdef
19	1.32000	def
20	1.50000	bcdef
21	1.30000	def
22	1.28000	def
23	1.50000	bcdef
24	1.32000	def
25	1.08000	f
26	1.50000	bcdef
27	1.50000	bcdef
28	1.70000	abcdef
29	1.65000	abcdef
30	1.65000	abcdef
31	1.45000	bcdef
32	1.25000	def
33	1.10000	f
34	1.40000	cdef
35	1.70000	abcdef
36	1.45000	bcdef
37	1.55000	bcdef
38	1.30000	def
39	1.40000	cdef
40	1.40000	cdef
41	1.30000	def
42	1.22500	ef
43	1.05000	f
44	1.60000	bcdef
45	1.45000	bcdef
46	1.30000	def
47	1.40000	cdef

$$DMS = 0.73743 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$$

$$MG = 1.54459 \quad CV\% = 11.69468$$

O número 1 (destacado em verde) representa o controle de crescimento de *G. citricarpa* e os dados grifados em amarelo indicam o extrato bruto da aroeira (17) e os dois extratos que reduziram o tamanho da colônia do fitopatógeno em 40% ou mais em sete dias de cultivo (LGMF658 Czapeck 7 dias = 43; LGMF698 MPE 7 dias = 25), ambos apresentam diferença estatística em relação ao controle (número 1) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
FONTE: O autor (2010)

APÊNDICE 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA *Guignardia citricarpa* COM 14 DIAS DE
CULTIVO

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46		36.24102	0.78785	14.3618 **
Resíduo	111		6.08917	0.05486	
Total	157		42.33019		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 46, 111 F-krit(1%) = 1.7365 F = 14.3618 $p < .00100$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	2.64000	abcd
2	2.62000	abcd
3	2.40000	abcdefgh
4	2.72000	abc
5	2.26000	abcdefghijkl
6	2.54000	abcdef
7	2.47500	abcdefg
8	2.60000	abcd
9	2.56667	abcde
10	2.90000	ab
11	2.30000	abcdefghijkl
12	2.35000	abcdefghijkl
13	2.20000	abcdefghijkl
14	2.38000	abcdefghi
15	2.24000	abcdefghijkl
16	2.28000	abcdefghijkl
17	1.27500	
18	1.95000	cdefghij
19	1.62000	hij
20	1.90000	defghij
21	1.32000	
22	1.66000	hij
23	2.25000	abcdefghijkl
24	1.52500	h j
25	1.54000	h j
26	2.40000	abcdefgh
27	2.95000	a
28	2.15000	abcdefghijkl
29	2.15000	abcdefghijkl
30	2.10000	abcdefghijkl
31	1.80000	efghij
32	1.45000	h j
33	1.10000	
34	1.95000	cdefghij
35	2.05000	a cdefghij
36	1.70000	e ghij
37	2.10000	abcdefghijkl
38	1.60000	hij
39	1.70000	e ghij
40	1.85000	defghij

continua

APÊNDICE 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS CONTRA *Guignardia citricarpa* COM 14 DIAS DE CULTIVO **continuação**

41	1.27500	
42	1.57500	h j
43	1.90000	defghij
44	2.35000	abcdehij
45	2.00000	a cdefghij
46	1.50000	h j
47	1.75000	efghij

$$DMS = 0.95592 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$$

$$MG = 2.07025$$

$$CV\% = 11.31342$$

O número 1 (destacado em verde) representa o controle de crescimento de *G. citricarpa* e os dados grifados em amarelo indicam o extrato bruto da aroeira (17) e os extratos que reduziram o tamanho da colônia do fitopatógeno em mais de 40% em 14 dias de cultivo (LGMF658 Czapeck 7 dias = 42; LGMF682 MPE 7 dias = 33; LGMF692 MPE 7 dias = 21), ambos apresentam diferença estatística em relação ao controle (número 1) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. FONTE: O autor (2010)

APÊNDICE 4 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS FÚNGICOS E DO ACTINOMICETO ENDOFÍTICOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi OBTIDOS PELA EXTRAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO COM ACETATO DE ETILA

RENDIMENTO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS – MEIO				
Nº	MPE 24h – meio	MPE 7 dias – meio	Czapeck 24h – meio	Czapeck 7 dias – meio
LGMF625	80mg	52mg	25mg	86mg
LGMF626	78mg	45mg	94mg	32mg
LGMF627	60mg	232mg	25mg	34mg
LGMF651	71mg	105mg	68mg	82mg
LGMF653	98mg	102mg	39mg	5mg
LGMF655	61mg	68mg	38mg	10mg
LGMF657	20mg	30mg	22mg	100mg
LGMF658	27mg	14mg	89mg	12mg
LGMF659	99mg	27mg	39mg	71mg
LGMF673	55mg	148mg	34mg	246mg
LGMF682	18mg	3mg	21mg	77mg
LGMF692	62mg	66mg	103mg	73mg
LGMF694	50mg	22mg	9mg	43mg
LGMF695	29mg	14mg	97mg	40mg
LGMF696	115mg	337mg	89mg	78mg
LGMF698	116mg	16mg	47mg	87mg
LGMF700	20mg	141mg	29mg	93mg
LGMF701	76mg	149mg	88mg	94mg
LGMF713	75mg	148mg	97mg	44mg
LGMF714	133mg	98mg	20mg	35mg

FONTE: O autor (2009)

APÊNDICE 5 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS FÚNGICOS E DO ACTINOMICETO ENDOFÍTICOS DAS FOLHAS DE *Schinus terebenthifolius* Raddi OBTIDOS PELA EXTRAÇÃO DO MICÉLIO FÚNGICO OU DA MASSA CELULAR DO ACTINOMICETO COM ACETATO DE ETILA

RENDIMENTO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS - MICÉLIO E MASSA CELULAR				
Nº	MPE 24h – micélio	MPE 7 dias – micélio	Czapeck 24h – micélio	Czapeck 7 dias – micélio
LGMF625	27mg	391mg	6mg	1165mg
LGMF626	214mg	185mg	76mg	3mg
LGMF627	26mg	169mg	10mg	54mg
LGMF651	190mg	81mg	83mg	1mg
LGMF653	104mg	216mg	3mg	19mg
LGMF655	73mg	218mg	0mg	20mg
LGMF657	60mg	143mg	1mg	135mg
LGMF658	12mg	162mg	12mg	233mg
LGMF659	24mg	445mg	7mg	157mg
LGMF673	4mg	200mg	3mg	5mg
LGMF682	12mg	11mg	12mg	10mg
LGMF692	37mg	94mg	0mg	9mg
LGMF694	24mg	286mg	1mg	12mg
LGMF695	15mg	152mg	1mg	86mg
LGMF696	19mg	139mg	3mg	5mg
LGMF698	15mg	227mg	5mg	63mg
LGMF700	20mg	245mg	4mg	29mg
LGMF701	16mg	155mg	10mg	311mg
LGMF713	12mg	160mg	9mg	16mg
LGMF714	10mg	106mg	12mg	8mg

FONTE: O autor (2009)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)