

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE
ANTAGONISTA À *Candida albicans* PRODUZIDAS POR
BACTÉRIA ENDOFITICA DA REGIÃO AMAZÔNICA**

IVANETE FERREIRA DE SOUZA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

IVANETE FERREIRA DE SOUZA

PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE
ANTAGONISTA À *Candida albicans* PRODUZIDAS POR
BACTÉRIA ENDOFITICA DA REGIÃO AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza

MANAUS

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S728p Souza, Ivanete Ferreira de
Prospecção de substâncias com atividade antagonista á *Candida albicans* produzida por bactéria endofítica da região amazônica /
Ivanete Ferreira de Souza. 2016
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Coorientadora: Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. biodiversidade. 2. antimicótico. 3. bactéria endofítica. 4. Amazônia.

I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III.

Título

A minha família que amo muito, pelo amor, pela admiração e por acreditarem na minha capacidade de vencer sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me conduzir pelas veredas da vida protegida com seu amor incondicional, misericordioso e infinito direcionando-me sempre no caminho do bem.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Spartaco Astolfi filho, pelo apoio, paciência e conhecimento compartilhado.

A professora Dr^a Antonia Souza, pela ajuda imprescindível e decisiva para finalização deste trabalho.

Aos meus familiares amados, minha mãe e irmãs Vanessy, Lúcia, Eliete, Eliuza, Elizângela, Arlete e ao meu irmão Milton e sobrinhos pelos momentos sempre bons e agradáveis, amor e constante apoio dispensado a mim.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM pelo suporte laboratorial e área física cedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial a secretaria do curso, Nubiane, pela presteza direcionada aos alunos.

A todos os colegas do laboratório de Tecnologia de DNA, pelo bom convívio diário, amizade e auxílio. Em especial a Elza Lima e Patrícia pelo trabalho diário dedicado a organização dos laboratórios.

A todos os colegas do GEMMA, pela simpatia e auxílio ao me receberem no laboratório.

Ao querido Edson do Carmo, pela amizade e por ser tão prestativo a mim e a todos os estudantes que frequentam o laboratório, mesmo nas horas em que encontra-se envolvido em suas tarefas de estudante, professor e orientador.

A técnica do laboratório Dr^a Enedina Nogueira, pela ajuda indispensável prestada ao meu trabalho.

A Dr^a. Fátima Almeida pelos valorosos auxílios nas horas de desalinho durante os experimentos e pela paciência e amizade durante essa caminhada.

A minha chefe, Alda Lira pela compreensão das minhas falhas ao longo desta caminhada e a todos os meus colegas e amigos da Policlínica Djalma Batista: Marcionília, Fabiane, Fagundes, Rosana, Airton, Keilane, Graça etc pela torcida e constantes palavras de apoio.

Aos amigos queridos, Júlio, André Santos, Vapecy, Irani, Beibe, Adriana e Leydiana pelos constantes incentivos durante essa caminhada.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia: Leissandra, Diego, Eliane, Weison, Sandro, Alana, Júlio Nino, Tiago Oliveira, pelos momentos de descontração e ajuda prestada.

A todos, meu muito obrigada!!!!

“Há homens que lutam um dia e são bons. Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muito anos e são muitos bons. Porém, há os que lutam toda a vida. E esses, são os imprescindíveis”

Bertolt Brech

RESUMO

A Biodiversidade Amazônica representa um grande potencial para descoberta de novas linhagens bacterianas produtoras de biomoléculas ativas de importância biotecnológica, como os antimicóticos que podem ser produzidos por microrganismos endofíticos cujo o alvo pode ser a levedura *Candida albicans*. Esta levedura está presente no corpo humano de forma comensal, sendo capaz de ocasionar graves infecções, principalmente em indivíduos com o sistema imunológico debilitado por doenças como câncer, AIDS e diabetes. Ela apresenta resistência aos antifúngicos disponíveis na atualidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi encontrar, a partir de bactérias da Amazônia, uma bactéria capaz de produzir moléculas ativas contra a levedura *C. albicans* a fim de fazer a produção de um extrato ativo que fosse possível fracionar e purificar a substância ativa. Na busca desta substância anti-candida, após a análise de bactérias de diversos habitats como águas dos Rios Negro e Solimões e de cepas oriundas de coleção de trabalho de bactérias endofíticas do Laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia da UEA tiveram inicialmente seu potencial antimicrobiano testado frente a diferentes microrganismos patogênicos (*Micobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) por estrias cruzadas. Os microrganismos com potencial foram selecionados e identificados por morfologia e pelas sequências da região 16S do rDNA. Fez-se o cultivo em dois meios de cultura diferentes para produção do extrato bruto. A verificação da ação anti-candida foi por testes de difusão em ágar e a quantificação desta através da Concentração Mínima Inibitória (CIM). O extrato produzido foi pré-purificado por cromatografia em coluna aberta e aplicou-se cromatografia em camada delgada (CCD) para acompanhamento das frações obtidas. Ao total seis bactérias endofíticas foram selecionadas por apresentarem atividade antimicrobiana contra ao menos um dos patógenos testados, porém, somente a bactéria 229 apresentou-se ativa contra *C. albicans* sendo cultivada para produção do extrato e tentativa de identificação da substância anti-candida. O meio de cultura que apresentou melhor produção da biomolécula foi o ISP2, conforme avaliação do tamanho dos halos a partir do extrato produzido. A colônia cultivada foi identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* e caracterizada morfológicamente como bacilos Gram positivo. A pre-purificação resultou em duas frações ativas com CIM de 0,25 e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Conclui-se desta maneira que na Amazônia é possível a identificação de bactérias com atividades farmacológicas a partir das quais pode-se produzir moléculas antimicóticas.

Palavras chave: biodiversidade, antimicótico, bactéria endofítica, Amazônia.

ABSTRACT

The Amazon Biodiversity symbolize Is a great potential to Discovery of new bacterial straight producer of active biomolecules with importance biotechnological as antimycotics that can be producing by endophytic microorganisms whose the object may be the yeast *Candida albicans*. This yeast is present in the human body as commensally, being able to cause serious infections, especially in individual immune depressed by diseases as cancer, AIDS and diabetes. It is resistant to antifungal available actually. This way, the object this study was find, from the Amazon bacteria, a bacteria able of produce actives molecules against the *C. Albicans* yeast, with a purpose to make the production of a active extract that make possible to fractionate and purify the active substance. In the search this anti-candida substance after a analysis of bacteria from different habitats as Waters of the Rio Negro and Solimões and strains derived from endophytic bacteria work collection of Applied Genetics Laboratory Health and Biotechnology of UEA, initially had their potential antimicrobial tested against different pathogenic organisms (*Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas ruginosa* and *Staphylococcus aureus*) by cross streaking. The potentials microorganisms were selected and identified by morphology and for sequences of the 16S rDNA region. The growth was made in two different culture media to production of crud extract. The verification the anti-candida action was by diffusion tests in Agar and the quantification was through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The extract produced was pré-purified by chromatography in open column and was applied thin layer chromatography (TLC) to check the fractions obtained. In total six endophytic bacteria were selected because they had antimicrobial activity against at least one of pathogens tested, but only the bacteria 229 presented active against *C. albicans* being cultivate to produce of extract and possibility of identified of anti-candida substance. The culture media that showed better production of biomolecules was the ISP2, according to analysis of size of the halos from of the extract produced. The colony growth was identified as *B. amyloliquefaciens* and morphologically characterized as Gram positive bacilli The pré-purification resulted in two actives fractions as MIC of 0,25 and 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. This way, conclude that in Amazon is possible the identify of bacteria with pharmacological activities from which can be produce antimycotic molecules.

Key words: biodiversity, antifungal, endophytic bacteria, Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1**-Estados morfológicamente distintos da *C. albicans* que é capaz de transitar da forma leveduróide para a forma de hifas representados em esquemas e imagens microscópicas..... 25
- Figura 2.** Aspecto clínico de infecções causadas pela *C. albicans*.1: Candidíase desenvolvida na mucosa 28
- Figura 3** Uma visão dos mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*. 1. Adesão das células da levedura pela expressão de adesinas; 2. Contato com as células hospedeiras através das junções celulares pela expressão de invasinas; 3. Fixação da levedura em elementos abióticos ou bióticos..... 30
- Figura 4:** Teste de estrias pareadas realizado com a bactéria 229, no meio ISP2 onde pode-se observar zonas de inibição da levedura *C. albicans* e da bactéria *S. aureus*. 47
- Figura 5:** Teste de estrias pareadas realizado com a bactéria 229, no meio sabouraud onde é possível observar zonas de inibição da levedura *C. albicans*. 47
- Figura 6:** Resultado da coloração de Gram realizada para caracterização morfológica das cepas com atividade antagonista. 48
- Figura 7:** Perfil eletroforético do DNA cromossomal das bactérias produtoras de biomoléculas. M-marcador, 1- 50, 2- 73, 3- 74, 4- 164, 5- 229.. 49
- Figura 8:** Perfil eletroforético da reação de PCR dos DNA's das bactérias selecionadas. 49
- Figura 9:** Resultado positivo de inibição da levedura *C. albicans* com primeiro teste de inibição por difusão em ágar aplicado com os extratos produzidos pela bactéria 229 nos meios ISP2 e sabouraud..... 53
- Figura 10:** Detecção da atividade antagonista a *C. albicans* em frações obtidas após a aplicação de uma cromatografia em coluna aberta no extrato da bactéria 229..... 56
- Figura 11.** Comparação dos tamanhos dos halos de inibição(mm) a *C. albicans* apresentados pelos extratos brutos e frações purificadas. 57
- Figura 12.**Resultado da Cromatografia em Camada Delgada realizada com as frações ativas após a cromatografia em coluna aberta. 57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Estrutura química dos principais antifúngicos utilizados	32
Tabela 1. Classificação taxonômica da levedura <i>C. albicans</i>	25
Tabela 2. Identificação das linhagens bacterianas endofíticas usadas neste trabalho	34
Tabela 3. Microrganismos utilizados no teste inicial para detecção da atividade antimicrobiana presente nas bactérias endofíticas contra <i>C. albicans</i>	35
Tabela 4. Reagentes da PCR juntamente com suas respectivas concentrações e quantidade utilizados para amplificar o DNA cromossomal extraído	37
Tabela 5. Resultado da inibição de microrganismos patogênicos frente aos meios de culturas utilizados no cultivo das bactérias endofíticas	46
Tabela 6. Resultado da análise do sequenciamento do DNA ribossomal região 16 s (ss-rDNA) por meio de BLASTn, para cepas bacterianas com atividade anticobiana.....	50
Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) contra os patógenos testados do extrato metanólico das linhagens endofíticas promissoras.....	54
Tabela 8. Frações obtidas durante o fracionamento do extrato bruto.....	55

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

ATCC- (American Type Culture Collection)- Coleção de microorganismos Norte americana

rDNA- DNA ribossomal

dNTP's- desoxirribonucleotídeos fosfatados

pmol/uL- picomol por microlitro

U/uL- Unidades por microlitro

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)- Ferramenta local para pesquisa de alinhamento básico.

rpm- rotação por minuto

PES- poliestireno

uM- micrometro

MeOH- metanol

SPE- Extração em Fase Sólida

C18- Octadecil sílica

DMSO – Dimetilsufóxido

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

BOD- Demanda Biológica de Oxigênio

CTT- Triphenyltetrazolium chloride- Trifenil de tetrazóico

NBT- Nitroblue Tetrazolium Chloride- Nitroazul de Tetrazóico

CLSI- Instituto de Manuais Clínicos e Padrões Laboratoriais

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

O.D- Densidade de Crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 A AMAZÔNIA E A DIVERSIDADE MICROBIANA	17
3.3 PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS POR MICRORGANISMOS.....	19
3.2.1 Técnicas utilizadas na pesquisa de moléculas bioativas	20
3.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	23
3.4 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE <i>Candida albicans</i>	24
3.4.2 Manifestações clínicas da doença	27
3.4.3 Fatores de virulência.....	29
3.5 ANTIMICROBIANOS DISPONÍVEIS CONTRA <i>C. albicans</i>	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	34
4.2 REATIVAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	34
4.3 AVALIAÇÃO PRIMÁRIA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
4.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS CEPAS BACTERIANAS COM PRINCÍPIO BIOATIVO.....	35
4.4.1 Coloração de Gram.....	35
4.4.2 Identificação taxonômica das cepas com princípio bioativo pela sequência do rDNA 16S.....	36
4.4.3 Extração do DNA cromossomal	36
4.4.5 Amplificação da região 16S do rDNA	36
4.4.6 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento	37
4.5 PRODUÇÃO PRELIMINAR DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA.....	38
4.5.1 Produção de moléculas com atividade antimicrobiana a partir das linhagens endofíticas	38
4.5.2 Preparação do extrato bruto	39
4.6 SELEÇÃO DA LINHAGEM ENDOFÍTICA PRODUTORA DE MOLÉCULA ATIVA CONTRA <i>C. albicans</i>	39
4.7 PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA	41
4.7.1 Cromatografia em coluna.....	41
4.7.2 Cromatografia de camada delgada (CCD)	41

4.8 BIOENSAIOS COM O EXTRATO BRUTO OBTIDO	42
<i>4.8.1 Teste de avaliação da concentração mínima inibitória (CIM).....</i>	<i>42</i>
<i>4.8.2 Teste de difusão em ágar.....</i>	<i>43</i>
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 AVALIAÇÃO PRIMÁRIA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	45
5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS CEPAS BACTERIANAS COM PRINCÍPIO BIOATIVO.....	48
5.3 PRODUÇÃO PRELIMINAR DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA E BIOENSAIOS COM O EXTRATO BRUTO OBTIDO	52
5.4 PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA	55
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS.....	59
8 ANEXOS	69
9 APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada a maior reserva de diversidade biológica do mundo (DELABONA, 2011) e destaca-se como um vasto campo a ser explorado em busca de microrganismos possíveis de serem utilizados em processos biotecnológicos.

Segundo Morais (2004), apenas 1% desta mega biodiversidade amazônica pode ter sido estudada do ponto de vista químico ou farmacológico, fato que realça a importância de estudos aprofundados da rica microbiota deste local.

A busca de novos agentes antimicrobianos vem sendo ponto crucial de vários setores do campo farmacêutico. Estudo dessa natureza é o ponto de partida para a descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, análises extremamente importantes, principalmente em um país como o Brasil com toda a sua grande biodiversidade (TEIXEIRA et al., 2013).

Os compostos bioativos em microrganismos de interesse industrial podem ser estruturas pertencentes ao metabolismo secundários das células microbianas e possuem alta relevância para o desenvolvimento de novas drogas, além de proteínas, mais corretamente inferindo as enzimas, podem também ser de grande valor biotecnológico na área farmacêutica e médica. Estes são capazes de produzir uma grande e diversificada quantidade de metabólitos primários e secundários que são divididos em moléculas fundamentais para a sobrevivência e crescimento desses organismos e em moléculas não essenciais produzidas na fase estacionária de crescimento como por exemplo os antibióticos.

Os microrganismos endofíticos são descritos, em maioria, como fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem causar-lhe mal algum, colonizando suas folhas, caule e partes aéreas (AZEVEDO, 1998). São diferentes dos microrganismos epífitos e fitopatogênicos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais e que causam doenças respectivamente.

Existe uma relação complexa entre endófitos e suas plantas hospedeiras. Acredita-se que os endófitos beneficiam indiretamente e diretamente o

crescimento das plantas através da produção de substâncias especiais como metabólitos secundários, principalmente, para impedir o crescimento ou atividade de agentes patogênicos de plantas (YU et al., 2010).

Microrganismos endofíticos, são fontes relativamente pouco estudadas e representam uma fonte de alto potencial para obtenção de novos produtos naturais para exploração na medicina, agricultura e indústria (STROBEL e DAISY, 2003).

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado e não satisfazem a necessidade médica completamente, devido a problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos agentes disponíveis (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004). Além disso, há o problema da resistência de linhagens patogênicas aos medicamentos disponíveis. Esses fatos exaltam a necessidade de pesquisas direcionadas a descoberta de novos de princípios ativos.

A *C. albicans* é uma levedura de forma oval, com brotamento, que produz pseudo-hifas tanto em culturas quanto em tecidos e exsudados. Trata-se de um microrganismo comum à microbiota humana coexistindo nas mucosas, pele e trato genital feminino. De acordo com Jawetz e colaboradores (1998), a *C. albicans* pode provocar doença sistêmica e progressiva em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, podendo também causar invasão na corrente sanguínea e ser transportada para muitos órgãos.

Valle e colaboradores (2010), relatam que a candidíase invasiva tornou-se uma das principais causas de mortalidade associada à micose em todo o mundo e que *C. albicans* é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em vários países. Por este motivo, esta espécie vem despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores.

O presente estudo caracteriza-se pela detecção de uma biomolécula com ação antifúngica, produzida por bactéria endofítica englobando, desta forma, a utilização de técnicas de pré-purificação de biomoléculas presente no extrato bruto celular produzido.

A pesquisa visou também, contribuir com a descoberta uma nova alternativa de terapia antifúngica, tendo em vista as restrições dos medicamentos existentes e a relevância clínica da levedura *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar uma ou mais bactérias endofíticas que produzam substância com efeito antagônico a *Candida albicans*, produzir extrato ativo e fracioná-lo na tentativa de purificar a (s) substância (s) ativa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar bactérias de origem endofíticas isoladas de plantas para verificar seu potencial de inibição frente a levedura *Candida albicans*.

- Efetuar a identificação taxonômica das sequências da região 16S do rDNA das linhagens com atividade antimicrobiana;

- Realizar cultivo com as bactérias previamente selecionadas para obtenção de extrato bruto contendo a substância inibidora da levedura *C. albicans*;

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido pela linhagem endofítica selecionada e determinar sua concentração mínima inibitória (CMI) frente a levedura confrontada.

- Proceder o fracionamento do extrato no sentido de purificar o princípio ativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A AMAZÔNIA E A DIVERSIDADE MICROBIANA

A Floresta Amazônica ou floresta equatorial da América do Sul é a região mais diversa em número de espécies biológicas e em área territorial. Segundo Silva et al. (2005), estima-se que na Amazônia Brasileira exista o equivalente a 40.000 espécies de plantas, 427 mamíferos, 1294 aves, 378 répteis, 427 anfíbios.

Somente em território brasileiro, a região amazônica ocupa cerca de 59,1% e 42% de área correspondente a região norte do Brasil (BORÉM & GIÚDICE, 2008). Essa região concentra mais de um terço das disponibilidades globais da diversidade biológica perfazendo uma das últimas extensões contínuas de florestas tropicais úmidas da Terra sendo, uma fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores (ALBAGLI 2001, SOUZA et al., 2004; VISENSTIN, 2011).

Fora essa diversidade citada, ainda se pode contar com inúmeras espécies microrganismos, entre eles, bactérias e fungos com enorme potencial para a elaboração de novos bioprodutos e descoberta de novos princípios ativos para elaboração de medicamentos. Porém, as espécies que compõem essa megabiodiversidade e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004) ou o potencial que estes possam ter para produção de moléculas inéditas e úteis ao homem.

Os microrganismos fazem parte da história evolutiva da Terra há 3-4 bilhões de anos iniciando quando detectou-se os primeiros fósseis desses seres vivos (PAN et al., 2010). Por aproximadamente 1,5 bilhão de anos, procariotos foram as únicas formas de vida na Terra (EVERT e EICHORN et al., 2014) desenvolvendo ao longo do tempo, a capacidade de sobreviver e se adaptar ao ambiente, bem como a de utilizar diversos meios e estratégias competitivas para sua existência (PAN et al., 2010).

Tratam-se de seres microscópicos definidos como fungos, bactérias, vírus e protozoários amplamente distribuídos pela Terra que, em geral, são associados as doenças que eles podem causar em humanos, animais e

lavouras (BARBOSA & TORRES, 2010). Porém, também são potenciais produtores de moléculas essenciais na produção de medicamento que ajudam a salvar milhares de vida como os antibióticos, e outros que prestam grande auxílio na saúde humana CONTI et al., 2012).

Estimativas do Ministério do Meio Ambiente dão conta que, em nível global, a diversidade de microrganismos exceda, em algumas ordens de magnitude, a diversidade de plantas e animais sendo que para procariotos, incluindo bactérias e arqueas, são conhecidas 4.314 espécies, alocadas em 849 gêneros, correspondendo entre 0.1 a 12% da diversidade do grupo.

O papel dos microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido, contudo, a participação destes nos processos ecológicos bastante importantes, tais como a fotossíntese oxigênica, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos e manutenção da fertilidade e estrutura de solos (HAWKSWORTH, 1991).

O conhecimento da diversidade microbiana gera inúmeros benefícios científicos e econômicos e quando micróbios potencialmente exploráveis são descobertos e passíveis de uso nos processos biotecnológicos, surgem novos antibióticos, agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação de poluentes e biolixiviação e recuperação de minérios. (CANHOS e MANFIO, 2001).

O aproveitamento dos recursos genéticos amazônicos, a partir de seus usos pelas novas biotecnologias, embora seja uma questão emergente, é ainda pouco compreendida, mensurada e principalmente incorporada às políticas governamentais e às estratégias empresariais direcionadas para a região (ALBAGLI, 2001).

Estudos feitos na região, apontam que a partir dos substratos amazônicos é possível encontrar muitos microrganismos capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como os realizado na pesquisa de Carneiro (2007) que avaliou a atividade citotóxica, antitumoral e antimicrobiana de espécies vegetais conseguindo produzir 75 extratos vegetais que mostraram potencial antimicrobiano contra patógenos como *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. E também no estudo de Silva (2008) que ao testar

71 isolados de actinomicetos associados a líquens verificou que 80% destes apresentaram potencial antimicrobiano.

Outros exemplos desse potencial microbiológico são demonstrados na pesquisa de Moraes (2004), que isolou 27 cepas endofíticas da andiroba das quais, 56% apresentaram antagonismo a *Staphylococcus aureus*. E também na pesquisa de Souza e colaboradores (2004) que verificaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia, encontrando 79 linhagens destes fungos dos quais 19 (24,05%) apresentaram atividades antagônicas contra um ou mais microrganismo-teste (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Bacillus sp.*) utilizados nos ensaios biológicos de antagonismo.

3.3 PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS POR MICRORGANISMOS

Uma das propriedades mais importantes dos microrganismos está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas. A busca de princípios bioativos de microrganismos é uma das áreas em que mais se investe nos países desenvolvidos, principalmente nas pesquisas de bioprospecção realizadas pelas indústrias farmacêuticas (PINTO et al., 2002).

A extraordinária atividade dos microrganismos está baseada em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (BURKE, 2011; DELABONA, 2011).

Sendo importante parte dos produtos naturais, o grupo de metabólitos secundários de microrganismos geralmente apresenta metabólitos bioativos (BERDY, 2005), sendo substâncias com peso molecular limitado (normalmente <3.000 Daltons) e de grande variedade estrutural (WILLIAMS et al., 1989).

Produtos derivados de metabólitos secundários têm sido usados nas áreas médica, industrial e agrícola, como os antibióticos, as drogas anticarcinogênicas, agentes imunossupressores, e polímeros para as aplicações industriais e tecnológicas, dentre outros (TEIXEIRA 2013; GUIMARÃES et al., 2010).

Os metabólitos secundários são as moléculas não essenciais para o crescimento celular. Geralmente são produzidos por algumas linhagens de uma

espécie e a produção geralmente ocorre quando a taxa de crescimento diminui e durante a fase estacionária. São exemplos de metabólitos secundários: antibióticos, pigmentos, ferormônios, certas toxinas, agentes imunomoduladores, agonistas e antagonistas normais que se ligam a receptores celulares e estimuladores de crescimento em animais e plantas (MORAIS, 2004).

A maioria dos metabólitos secundários são moléculas orgânicas complexas, que requerem um grande número de reações enzimáticas específicas para a sua síntese, sendo seus compostos iniciais originários das principais vias metabólicas (MADIGAN et al., 2010).

A produção de compostos bioativos, através do metabolismo está inter-relacionada com as condições de cultura, com período de incubação, pH do meio, nutrientes e temperatura. Tais condições permitem adequações para otimização dos processos de produção.

3.2.1 Técnicas utilizadas na pesquisa de moléculas bioativas

A purificação de biomoléculas é importante para determinação das suas características únicas como tamanho, carga, forma, função. A extração destas, a partir de colônias microbianas é o passo inicial para esse processo (TAN e YIAP, 2009). Durante muito tempo o processo de elucidação estrutural era empírico, onde se empregavam processos degradativos e obtenção de derivados, o que muitas vezes induzia a erros (STEFANI e NASCIMENTO, 2007).

No século XVIII houve um despertar dos químicos para os componentes produzidos por células, levando-os ao desenvolvimento de técnicas para separar, purificar e analisar as moléculas celulares. A partir de então, métodos de separação foram desenvolvidos e aprimorados como os diferentes métodos cromatográficos (cromatografia em papel, eletroforese, troca iônica, entre outros), havendo mudanças também para a elucidação estrutural destas moléculas que passou a ser mais precisa com o desenvolvimento das técnicas espectroscópicas, o que ocasionou avanço na descoberta de substâncias bioativas (RATTI, 2009).

No decorrer dos anos foram desenvolvidas técnicas aprimoradas de elucidação estrutural de compostos orgânicos como a espectrometria de

massas (EM), espectroscopia no infravermelho (IV), no ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN) o que permitiu maior precisão e confiabilidade dos resultados na elucidação de estruturas. O infravermelho é um método espectroscópico de análise que fornece informações quanto aos grupos funcionais que podem estar presentes na estrutura das substâncias. A ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 indica a disposição do esqueleto hidrocarbônico, ou seja, as diferentes situações de ambientes químicos dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura (RIBEIRO e SOUZA, 2007).

A espectroscopia de massas, por sua vez, além de fornecer dados que permitam determinar a fórmula, pode contribuir na elucidação estrutural através dos padrões de fragmentação inerente às diferentes funções orgânicas. Esses métodos constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação destas substâncias, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação (LOPES e FASCIO, 2004).

O processo de purificação de biomoléculas proveniente da fermentação envolve uma série de etapas, muitas das quais com elevado valor, devido à dificuldade de se recuperar compostos celulares muito diluídos. Dentre estas etapas, destacam-se inicialmente, a filtração do fermentado para separação dos sólidos e células presentes, seguido do isolamento do produto, o qual pode ser por extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) ou por técnicas de separação cromatográfica (MAYER et al., 1996, YONAMINE, 2009).

A extração líquido-líquido (LLE) foi muito utilizada no preparo e eliminação de interferentes da amostra há pouco tempo atrás. É uma técnica que baseia-se na solubilidade seletiva por parte dos analitos encontrados numa determinada matriz, mais que caiu em desuso por apresentar desvantagens como procedimento lento, dispendioso, que exige grandes volumes de solventes orgânicos e por praticamente inviabilizar um possível processo de automação (LANÇAS, 2004, RODRIGUES, 2007).

Separação em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de extração mais utilizadas. Foi introduzida e meados da década de 1970, sendo utilizada para

análise de diversos tipos de compostos e amostras, para a pré- concentração e extração dos analitos (MACEDO, 2012). Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo adsorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para lavar os analitos de interesse. Apesar da SPE apresentar vantagens com relação aos métodos mais clássicos, tais como praticidade e maior sensibilidade, esta técnica tem algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de dessorção do analito aprisionado no cartucho de SPE que requer geralmente, o uso de solventes tóxicos (BARRIONUEVO e LANÇAS, 2001).

Entre os vários processos de separação de biomoléculas estão a cromatografia de troca iônica, a filtração em gel e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC ou CLAE) que propicia mais rapidez e eficiência ao processo de separação de misturas biomoleculares.

O sistema cromatográfico é o conjunto formado pela mistura a ser analisada (M), pela fase fixa (FF) e pela fase móvel (FM). A fase fixa é o meio constituído por um sólido poroso, cuja função é reter os solutos, a fase móvel é o eluente que flui através da fase fixa e tem como função deslocar solutos. Nesse sistema, a mistura de solutos é levada a migrar através da fase fixa, por meio de fluxo constante da fase móvel, sendo a diferença de velocidade de migração provocada por processo de competição pelo soluto, entre as duas fases, em função de uma dada propriedade (MATOS, 2009).

A cromatografia de troca iônica para a separação de biomoléculas foi introduzida na década de 1960 e continua a desempenhar um papel importante na separação e purificação de biomoléculas sendo uma das técnicas mais frequentemente utilizadas para a purificação de proteínas, peptídeos, ácidos nucléicos e outras biomoléculas, oferecendo separações de alta resolução e com alta capacidade de adsorção. Seu princípio básico baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária. A técnica é capaz de separar espécies moleculares com apenas pequenas diferenças em suas propriedades de carga, por exemplo, duas proteínas (PESSOA Jr, 2005).

A filtração em gel é a mais simples e mais suave de todas as técnicas de cromatografia podendo ser utilizada diretamente após a troca iônica, interação hidrofóbica, ou de afinidade, uma vez que a composição do tampão não afetará a separação final das moléculas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, requerendo somente que a amostra seja solúvel na fase móvel sendo um método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como uma imensa variedade de outros compostos de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica. (TONHI et al., 2002). Conforme Quintão (1991), se comparada com outros métodos de cromatográficos a HPLC caracteriza-se por utilizar colunas menores em que as partículas sólidas constituintes da coluna são também mais pequenas e esféricas e por haver alta pressão no interior do sistema, o que aumenta a velocidade da fase móvel contribuindo para a manutenção de um fluxo constante e uma velocidade linear do fluxo. Essa técnica pode utilizar um sistema isocrático, em que a composição do solvente é constante, ou um sistema de gradientes em que a composição do solvente é variável ao longo do tempo.

Todas essas técnicas são de grande importância para a pesquisa de novos antibióticos e antifúngicos. Bachiega *et al.* (2005) utilizando-se de técnicas espectroscópicas (UV – VIS, espectrometria Infravermelha e espectrometria RMN 1H) elucidaram a estrutura de um antibiótico contra a *C. albicans*. A mesma técnica foi utilizada por Ujikawa (2003) em seu estudo de metabólitos farmacologicamente ativos produzidos por microrganismos da microbiota nativa utilizando espectrofotômetro UV-VIS.

3.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros (AZEVEDO, 2000; ASSUNPÇÃO, 2009; EMBRAPA, 2015). Esses microrganismos podem ser isolados de tecidos desinfectados das

plantas, como as flores, frutos, folhas, caules, raízes e sementes, podendo ser isolados de várias espécies vegetais (ESPOSITO-POLESI, 2011; CHAGAS, 2013).

Das cerca de 300 mil espécies de plantas superiores que existem na Terra, cada planta individual, dos bilhões que existem, é anfitriã de um ou mais endófitos (STROBEL,2004).

Esses microrganismos podem adentrar plantas hospedeira por aberturas naturais como as emergências de raízes naturais secundárias laterais que sempre é acompanhada de um rompimento do tecido vegetal, assim como por abrasões decorrentes do crescimento da raiz no solo. Também podem ser vias de entradas aberturas naturais como estômatos e hiadatódios, aberturas ocasionadas por insetos e até por fungos patogênicos como os apressórios (AZEVEDO, 1998).

Muitos microrganismos não patogênicos da rizosfera podem ativar mecanismos de defesa da planta e induzir uma resposta sistêmica ativando vias de sinalização que levam à maior resistência ao patógeno do hospedeiro, chamada indução á resistência sistêmica quando são introduzidos em seu interior (MARELA, 2014). Estudos apontam que durante essa colonização do hospedeiro os microrganismos endofíticos se adaptam ao microambiente vegetal e assimilam parte do DNA da planta em seu genoma adquirindo a capacidade de biossíntese de compostos bioativos (ESPOSITO-POLESI,2011; KOUR et al., 2008). Dessa forma esses microrganismos podem produzir compostos naturais como toxinas, antibióticos e antitumorais, alcalóides e terpenóides (AZEVEDO, 1998; ESPOSITO-POLESI, 2011; QUIN *et al.*,2011), o que os torna fonte potenciais de novos produtos biotecnológicos .

3.4 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE *Candida albicans*

C. albicans é uma levedura oportunista de amplo habitat, sendo encontrada no em todas as espécies primatas existentes (SIDRIM e ROCHA, 2004) e no homem.

Microscopicamente, apresenta elementos arredondados gemulantes como os blastoconídios, hifas e pseudo-hifas (Figura 1), conforme Mezzari e Cauduro (1996), sendo considerada um microrganismo dimorfo.

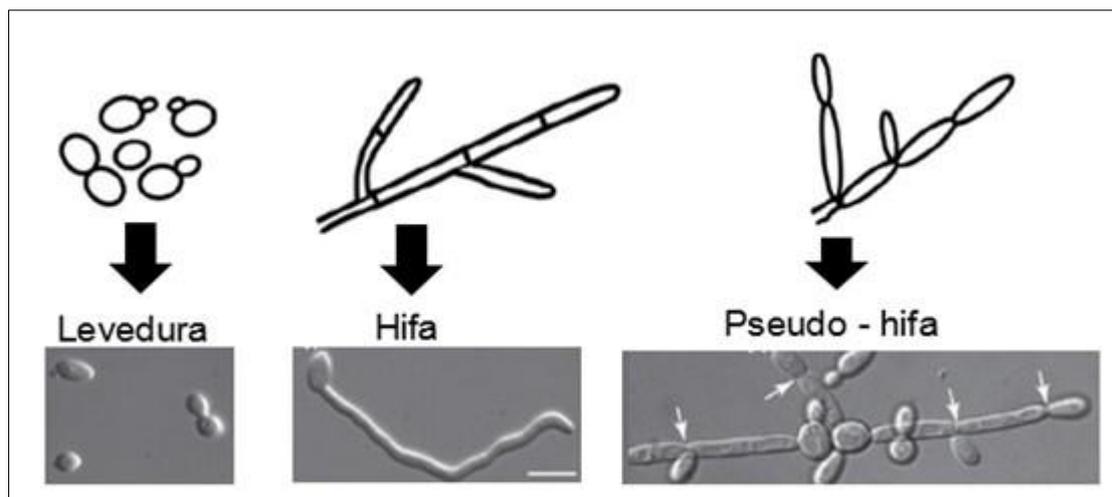


Figura 1-Estados morfológicamente distintos da *C. albicans* que é capaz de transitar da forma leveduróide para a forma de hifas representados em esquemas e imagens microscópicas (adaptado de <http://hdl.handle.net> e Cardoso, 2013).

Este microrganismo foi denominado 111 vezes por diferentes nomes no decorrer do tempo. Foi observado pela primeira vez por Langenbeck em 1839 na boca de pacientes com tifo, descrita por Gruby em 1842, perante a Academia de Ciências de Paris como agente causador do sapinho em crianças, porém com denominação errônea. Somente foi adequadamente classificada em 1923 (Tabela 1), quando Christine Berkhout criou a denominação *Candida albicans* aceita até hoje (SIDRIM e ROCHA, 2004; Oliveira, 2014).

Tabela 1: Classificação taxonômica da levedura *Candida*.

Fonte: GIOLO e SVIDZINSKI, 2010.

Filo	Deuteromycota
Classe	Blastomycetes
Família	Cryptococcaceae
Gênero	<i>Candida</i>
Espécie	<i>Candida albicans</i>

C. albicans é um microrganismo comensal que não apresenta qualquer infecção prejudicial em pessoas saudáveis (BASTOS et al., 2003; HOLANDA, 2007; De Rossy et al., 2011), colonizando mucosas do trato gastrointestinal

(50 a 70%), boca (30 a 50%), vagina (5 a 30%) e pele (4 a 7%), (SILVA et al., 2002).

Aproximadamente 80% a 90% da parede celular de *C. albicans* é composto por hidratos de carbono, que são representados basicamente pelos polissacarídeos β -glucanas, quitina e manoproteínas associados com outras constituintes como proteínas e lipídios (SIQUEIRA Jr e SEN, 2004). Além de fornecer rigidez e proteção para a célula, a parede da célula fúngica desempenha um papel essencial em praticamente todos os aspectos da biologia e patogenicidade de *C. albicans*(CHAFFIN et al, 1998).

3.4.1. A candidíase

Candidíase (com sinonímia de candidose, monilíase e sapinho) é uma doença causada por leveduras do gênero *Candida* e é considerada a mais universal das infecções oportunistas (FALCÃO et al., 2004), atingindo as mucosas oral e vaginal de forma superficial ou sistêmica (CARDOSO, 2013).

Numerosas doenças graves podem desencadear o desenvolvimento da candidíase tais como leucoses, câncer, tuberculose, cirrose hepática, hepatite epidêmica, mieloma múltiplo. Mas as alterações mais importantes que favorecem a candidíase é o diabetes mellitus e a AIDS (OLIVEIRA, 2014). Outros fatores também contribuem para as infecções fúngicas, dentre os quais destacam-se: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER MA e DIEKEMA, 2007).

A doença causada por essa levedura também produz invasão da corrente sanguínea do hospedeiro. Álvares (2007) e Oliveira (2014) relatam que a introdução da *Candida* no sangue dá por acessos intravenosos, cateteres, diálise peritoneal, cirurgia cardíaca ou uso de drogas intravenosas.

Essa infecção, atinge principalmente crianças e pessoas idosas. Seu aparecimento na mucosa oral em indivíduo anteriormente saudável sem fatores de risco conhecidos é mencionado como motivo de suspeita de infecção por HIV (WEINDL, 2010; PEIXOTO et al.,2014).

A *C. albicans* é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em vários países (VALLE, 2010), e a mais conhecida do

gênero por ser considerada a de maior interesse clínico por ainda corresponder ao principal agente de infecções fúngicas em humanos. Em casos de septicemia causada por candidemia nosocomial há estudos que apontam mortalidade em torno de 40% a 60% de pacientes, sendo a *Candida albicans* a espécie mais isolada nesses casos (GUDLAUGSSON, 2003; FRANÇA et al., 2008; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

Do ponto de vista taxonômico, são reconhecidas cerca de 200 espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, das quais 10% podem causar infecções em seres humanos. Segundo Adrioli e colaboradores (2009), embora a *C. albicans* seja a espécie mais isolada em casos infecciosos (principalmente em pacientes com candidíase vulvovaginal- CVV), outras espécies, tais como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* também podem desencadear processos infecciosos.

3.4.2 Manifestações clínicas da doença

Conforme Peixoto e colaboradores (2014), as manifestações clínicas da doença são variadas (Figura 2), podendo gerar infecção nas mucosas (candidíase orofaríngea, esofagite, candidíase vulvovaginal e balanite), infecção cutânea e em órgãos internos de forma sistêmica.

A candidíase mucocutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal, sendo a forma mais comum nos seres humanos. A candidíase cutânea pode acometer áreas úmidas do corpo como: espaços interdigitais, regiões das mamas, axilas, pregas das virilhas, debaixo de unhas. Na forma sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos (pulmões, rins, bexiga, coração, olhos) causando candidíase pulmonar, candidemia, endocardite, nefrite e outros atingindo principalmente em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, doenças imunossupressivas e após transplantes de órgãos (BARBEDO e SGARBI, 2010; PEIXOTO et al., 2014).



Figura 2. Aspecto clínico de infecções causadas pela *C. albicans*. 1: Candidíase desenvolvida na mucosa oral. 2: Balanite em órgão genital masculino. 3: candidíase cutânea na região das mamas.

Infecções invasivas causadas por essa levedura associam-se a internação prolongada (três a 30 dias), alta taxa de mortalidade (10% a 49%) e elevado custo hospitalar. Em casos de infecção grave e sistêmica, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica (MIMICA et al, 2009).

Essas infecções são as manifestações usuais da doença e, embora normalmente não apresentem ameaça à vida, podem representar um problema de considerável importância socioeconômica (ÁLVARES et al., 2007) em decorrência da distribuição do microrganismo em todas as camadas sociais.

A levedura pode atingir os órgãos genitais masculinos e femininos, causando infecções como a balanite e a vulvovaginite. A vulvovaginite pode ser caracterizada clinicamente por sintomas que causam grande desconforto para a paciente, como prurido intenso, ardor, eritema, fissuras na pele, odor malcheiroso, disúria (dor, ardor ou sensação de queimação ao urinar), dispareunia (dor durante o ato sexual) e corrimento esbranquiçado, consistente, semelhante a “leite talhado” (CARVALHO, 2007). Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio em sua vida, sendo que destas, 40% a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingirão o caráter recorrente (MARDH, 2002, ÁLVARES et al., 2007)

Para as candidoses vulvovaginais são relacionadas várias causas. As principais são o uso de antibióticos que alteram a microbiota bacteriana vaginal normal ocasionando o aparecimento do microrganismo patogênico, o uso de

contraceptivos orais com elevada concentração de estrogênio predispondo desenvolvimento de cândida, a gravidez, o *diabetes mellitus* descompensado, a imunossupressão, o uso de roupas sintéticas ou apertadas diminuindo a ventilação vulvar, a deficiência de ferro e zinco e a quantidade anormal de lactobacilos na vaginite (BASTOS et al., 2003).

A balanite (ou balanopostite, inflamação aguda ou crônica da glândula do pênis) pode ser assintomática, com apenas um leve prurido, ou sintomática, iniciando-se com vesículas no pênis que evoluem nos casos intensos, gerando placas pseudomembranosas, eritema generalizado, prurido intenso, dor, fissuras, erosões, pústulas superficiais na glândula e no sulco balanoprepucial (PEIXOTO et al., 2014). Leveduras de *Candida* presentes na genitália masculina, numa função sapróbia, nutrem-se de restos celulares e tem a sua proliferação favorecida por ambientes quentes e úmidos, como ocorre na região do prepúcio e microtraumatismo peniano que resulta de uma atividade sexual pode ser suficiente para desencadear o processo de instalação de uma balanopostite por *Candida* (RIBEIRO et al., 2014).

3.4.3 Fatores de virulência

C. albicans pode desencadear um processo infeccioso grave por desequilíbrios relacionados ao organismo do hospedeiro e a mecanismos de transformação da levedura, que pode passar da forma comensal para agente de infecções invasivas (SILVA, 2011).

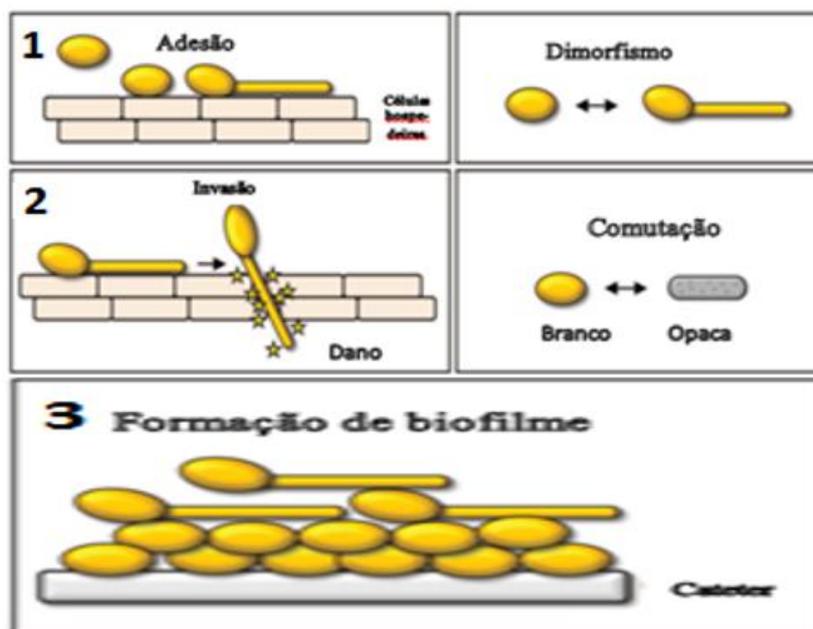
A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a condições ambientais ideais de pH, temperatura e disponibilidade de soro (NAVARRO-GARCIA et al. 2000; TAMURA et al., 2007).

A *C. albicans* é capaz de crescer em diferentes formas morfológicas e utiliza-se da capacidade de alternância entre levedura para ter capacidade de virulência. Ambas as formas morfológicas são importantes durante a infecção. A forma leveduróide provavelmente dissemina-se através da corrente sanguínea, espalhando o organismo para diferentes nichos do hospedeiro,

enquanto que a forma de hifas é invasivo e permite que o organismo escape das células fagocíticas (GIL-BONA et al., 2015).

Os fatores relacionados ao hospedeiro, que propiciam a proliferação do microrganismo ocasionando infecções, em geral estão relacionados aos avanços na medicina, como o grande número de procedimentos invasivos, que quebram as barreiras de proteção natural do organismo, como a utilização de cateteres intravenosos e sondas (CASTRO et al., 2006). Também estão relacionados a estes fatores, uso de antibiótico de amplo espectro (que suprimem a microbiota natural) e a diminuição acentuada do número de neutrófilos causada por doenças como a Síndrome de Imunodeficiência (SIDA) e neoplasias (CASTRO et al., 2006; SILVA, 2011).

Os principais fatores de virulência que a *C. albicans* (Figura 3) expressa durante o processo infeccioso incluem dimorfismo (capacidade para crescer em qualquer forma micelial ou levedura), fatores de adesão, a mudança fenotípica, tigmotropismo (capacidade de identificar junções intercelulares na superfície da mucosa em contato com a detecção e a sua penetração no alvo), e a secreção das enzimas hidrolíticas, tais como lipase, fosfolipase e proteinase (WEINDL, 2010; SILVA, 2011).



Fonte: Adaptado de MAYER et al., 2003.

Figura 3. Uma visão dos mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*. 1. Adesão das células da levedura pela expressão de adesinas; 2. Contato com as células hospedeiras através das junções celulares pela expressão de invasinas; 3. Fixação da levedura em elementos abióticos ou bióticos.

Espécies de *Candida* têm moléculas de superfície que propiciam sua adesão ao tecido hospedeiro. Essas moléculas são manoproteínas que tem atividade enzimática e função de receptores homólogos que promovem a adesão em células hospedeira e tecidos (SIQUEIRA Jr e SEN, 2004).

Essas moléculas receptoras podem ser uma lectina ou uma integrina CR3. A primeira liga-se a açúcares nas células epiteliais e a segunda ao ácido arginina-glicina-aspartico (RGD) em grupos iC3b, fibrinogênio, fibronectina, laminina, vitronectina (CALDERONE e BRAUN,1991).

3.5 ANTIMICROBIANOS DISPONÍVEIS CONTRA *C. albicans*

Apesar do aumento no número de antimicóticos comercialmente disponíveis nos últimos anos, estes ainda encontram-se em desvantagem quando comparados as drogas antibacterianas. Além disso, resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica (BATISTA et al., 1999).

Agentes antifúngicos são substâncias ativas contra fungos. Em geral são classificados como antimicrobianos, que são usualmente definidos por Davies e Davies (2010) como qualquer classe de moléculas orgânicas que inibem ou matam micróbios por interações específicas com alvos bacterianos, sem qualquer consideração da fonte do composto ou classe em particular.

Os fungos patogênicos, por serem eucariontes, possuem uma estreita relação com seus hospedeiros mamíferos. Desta forma, muitas vias bioquímicas existentes em fungos que poderiam atuar como alvos são compartilhadas pelo hospedeiro mamífero, o que justifica a dificuldade em se usar muitos antifúngicos potenciais por causarem toxicidade ao hospedeiro (JAWETZ et al., 1998). O antifúngico ideal do futuro deve apresentar um largo espectro de atividade fungicida, possuindo um mecanismo de ação que limite a toxicidade. Para se encontrar um novo antifúngico de referência, é necessário encontrar um alvo eficaz, que elimine as células fúngicas sem atacar ou prejudicar as células humanas (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006).

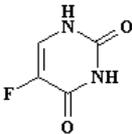
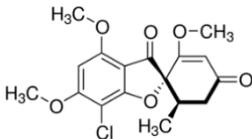
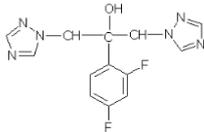
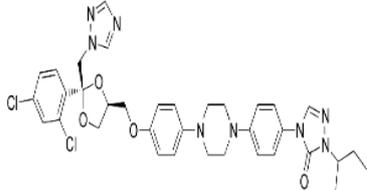
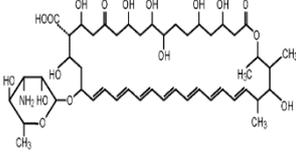
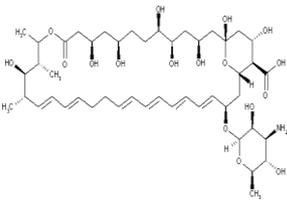
Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e

nistatina), excetuando-se a flucitosina (1) e a griseofulvina (2), que atuam no núcleo celular impedindo a síntese de ácido nucléico (LACAZ & NEGRO, 1991).

No que concerne ao modo de ação da flucitosina sabe-se, conforme Nobre et al. (2002), que este medicamento é convertido em 5-fluorouracil na célula fúngica, pela enzima citosina desaminase, que é metabolizado em ácido 5-fluorodesoxiuridílico, o qual inibe a timidilato sintetase. O 5-fluorouracil é incorporado ao RNA em substituição ao uracil, alterando a síntese protéica na célula fúngica. Já o modo de ação da griseofulvina não é totalmente compreendido. Contudo, supõe-se que esta droga causa interferência no sistema de desenvolvimento microtúbulos das células, perturbando a estrutura do fuso mitótico e conseqüentemente inibindo a síntese de ácido nucleico (FINKELSTEIN et al., 1995).

Os principais agentes antifúngicos utilizados na terapia de infecções causadas por *C. albicans* são azóis tais como fluconazol e itraconazol, e os polienos, compostos tais como anfotericina B e nistatina (NAVARRO-GARCIA et al., 2000), discriminados no Quadro 1. Esses medicamentos atuam na inibição da biossíntese do ergosterol da membrana do fungo resultando na sua fluidez.

Quadro 1: Estrutura química dos principais antifúngicos utilizados contra *C. albicans*.

Fluocitosina (1)	Griseofulvina (2)	Fluconazol (3)
		
Itraconazol (4)	Anfotericina B (5)	Nistatina (6)
		

Os azóis são antimicóticos, químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e fungos filamentosos, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Os

imidazóis foram descobertos em 1949, sendo que o nitrato de imidazol foi utilizado experimentalmente pela primeira vez em 1967.

A ação fungistática ou fungicida é dependente da concentração da droga. Recentemente os triazólicos têm recebido maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos. E pela sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (LACAZ e NEGRO, 1991; FRANÇA, et al., 2008). A resistência cada vez maior de fungos a substâncias derivadas de azoles como resultado de tratamentos de longo prazo podem limitar o uso destas drogas no futuro (OLIVEIRA, 2011; NAVARRO-GARCIA et al., 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A pesquisa seguiu com a análise de seis cepas endofíticas pertencentes a coleção de trabalho do Laboratório de Genética Aplicada a Saúde e Biotecnologia (Tabela 02) gentilmente cedidos pela Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (FCA/UFAM).

Tabela 02: Linhagens bacterianas endofíticas usadas neste trabalho.

Número da Coleção	Código de Isolamento	Planta Hospedeira	Tecido de Isolamento	Resultado do Gram
39	GhcR3 2.1	<i>Gustavia eliptica</i>	Casca da Raíz	+
50	GhcC1 2.1a	<i>Gustavia eliptica</i>	Casca do Caule	+
73	Ma06C1 2.1	Macrofita aquática (N.I.)	Caule	+
74	Ma06C2 4.1	Macrofita aquática (N.I.)	Caule	+
164	PpC1 2.2b	<i>Photomorfa peltata</i>	Caule	+
229	DfGa1 1.2	<i>Duguetia flagellaris</i>	Galho	+

4.2 REATIVAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias preservadas foram reativadas nos meios ágar ISP2 e no ágar Sabouraud (Anexo A) para realização da pesquisa. Nas linhagens que apresentaram necessidade, realizou-se purificação por estrias cruzadas. Após a realização dos repiques as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 30°C.

4.3 AVALIAÇÃO PRIMÁRIA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Utilizando-se uma colônia de cada microrganismo reativado, realizou-se o teste de estrias pareadas também chamado de culturas pareadas, conforme metodologia de Christensen (1996), para verificação do seu potencial antagônico frente a levedura *C. albicans* e a outros microrganismos patogênicos (Tabela 3) por meio de observação da zona de inibição.

Tabela 3. Microrganismos utilizados no teste inicial para detecção da atividade antimicrobiana presente nas bactérias endofíticas contra *C. albicans*.

Microrganismo	ATCC
<i>Candida albicans</i>	10231
<i>Staphilococcus aureus</i>	6538
<i>Micobacterium smegmatis</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027

Neste cultivo, repicou-se em meio de cultura apropriado (Sabouraud e ISP2) de modo diametral na placa de Petri o microrganismo a ser testado, incubou-se por 48h a 30°C e posteriormente repicou-se o patógeno de modo horizontal incubando-se por mais 24 h a 30°C.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS CEPAS BACTERIANAS COM PRINCÍPIO BIOATIVO

Para se ter conhecimento das características morfológicas das linhagens estudadas foi aplicada a coloração de Gram (HARLEY, 2005) e para identificação taxonômica foi realizado o método de amplificação e sequenciamento do 16S rDNA (SANGER et al., 1975). Para essa identificação foram executadas as etapas que seguem.

4.4.1 Coloração de Gram

Em todas as bactérias testadas, aplicou-se a coloração de Gram para verificação da pureza e forma das colônias. Nesta análise, preparou-se o esfregaço em uma lâmina de vidro limpa com uma gota de água onde emulsionou-se o microrganismo retirado do cultivo em meio semi-sólido espalhando-se até formar uma película fina a ser fixada rapidamente na chama do bico de Bussen.

A técnica de coloração foi realizada cobrindo-se o esfregaço fixado com corante cristal violeta e solução aquosa de iodeto de potássio (Lugol) por um minuto respectivamente e retirando-se o excesso lavando com água corrente. Descolorindo-se a lâmina com etanol 95% por 30 seg. e retirando-se com água corrente. E por último, cobrindo-se o esfregaço com solução de fucsina por 30 seg. e removendo-se o excesso do corante lavando-se a lâmina com água corrente. Após as etapas de coloração retirou-se o excesso de água da lâmina deixando-a secar a temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de maior aumento (imersão 100X) utilizando-se óleo de imersão.

4.4.2 Identificação taxonômica das cepas com princípio bioativo pela sequência do rDNA 16S

As linhagens estudadas foram identificadas pelo método de amplificação e do DNA (PCR) e seqüenciamento da região 16S do rDNA. Para essa identificação foram executadas as etapas que seguem.

4.4.3 Extração do DNA cromossomal

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit comercial Purelink™ (Invitrogen) e o material genômico extraído foi armazenado a 4°C. O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% preparado com tampão TEB 1X e corado com 2µL (10µg/mL) de brometo de etídio na concentração final de 1,6 µg/mL e submetido a corrida eletroforética.

4.4.5 Amplificação da região 16S do rDNA

Para a amplificação da região 16S do rDNA sequências de cerca de 1000 pb foram amplificadas a partir do DNA cromossomal, utilizando os primers 530F (5'- TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG-3') e 1492R (5'- TGACTGACTGAGAGCTCTACCTTGTTACGMYTT -3'). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita em um volume final de 25 µL contendo os reagentes descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Reagentes da PCR juntamente com suas respectivas concentrações e quantidade utilizados para amplificar o DNA cromossomal extraído.

COMPONENTE	(uL) /x 1	uL/ x7
H ₂ O MILI-Q	11,95	83,65
MGCL ₂ (25 mM)	1,25	8,75
TAMPÃO 10X	2,5	17,5
DNTP'S (2,5mM)	2,5	17,5
PRIMER F (5,0 PMOL/uL)	2,0	14
PRIMER R (5,0 PMOL/uL)	2,0	14
TAQ POLIMERASE (5U/uL)	0,3	2,1
DNA	5,0	35,0
VOLUME FINAL	25,0	175

Foi utilizado o termociclador da marca BIO RAD (modelo T100™ Thermal Cycler) programado para gerar uma desnaturação inicial de 3 min. a 95 °C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., anelamento a 59°C por 15 seg., extensão a 72°C por 45 seg. e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% preparado com tampão TEB 1X e corado com 2uL (10mg/mL) de brometo de etídio na concentração final de 1,6 ug/mL. Cinco microlitros de amplicons foram misturado em 5uL do tampão de amostra TBE 5X. O marcador de peso molecular a ser utilizado para confirmação do tamanho dos fragmentos foi o de 1Kb (Athermo científico). O gel de eletroforese será submetido a uma corrida eletroforética em tampão TEB1X iniciando à 85V para saída das amostras dos poços e seguindo à 100V para a separação das bandas.

4.4.6 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento

O produto amplificado foi purificado com o kit comercial IllustraGFX™ (GE) e submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger et al. (1975)

utilizando-se o sequenciador da Applied Biosystems/ HITACHI, modelo 3130 Genetic Analyzer.

As sequências obtidas através do procedimento de sequenciamento foram comparadas com as depositadas no Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Toll).

4.5 PRODUÇÃO PRELIMINAR DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA

Toda a etapa de produção da substância foi realizada no Laboratório de Tecnologia do DNA, enquanto que a parte de preparação e purificação do extrato bruto, assim como os ensaios de atividade biológica foram realizados no Laboratório de Microrganismos e Bioensaios - UFAM.

4.5.1 Produção de moléculas com atividade antimicrobiana a partir das linhagens endofíticas

O cultivo inicial foi realizado com todas as linhagens avaliadas no teste de culturas pareadas em dois meios de cultura diferentes: ISP2 e sabouraud líquidos.

As cepas endofíticas foram reativadas em estrias cruzadas em placas contendo o meio ágar ISP2 e sabouraud sólidos e incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 30°C. Colônias dos respectivos microrganismos foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos contendo o meio ISP2 líquido que foram incubados a 30°C em agitador orbital por 18 h sob agitação de 150rpm.

A produção do metabólito em meio líquido foi realizada em erlemeyers de 500mL, contendo 100 mL dos meios ISP2 e sabouraud e 100 uL do pré - inóculo referente a cada endofítico. Após a inoculação, todos os frascos foram incubados em agitador orbital por 60 h a 30°C e o líquido metabólico produzido foi recuperado. Todo o experimento foi conduzido em duplicata e como controle negativo utilizou-se 100 mL dos meios de cultivo isento de microrganismos.

Na recuperação do líquido metabólico correspondente a cada linhagem adicionou-se 50mL do mesmo em tubos falcons e centrifugou-se o material duas vezes em centrifuga refrigerada a 4°C a 4.000rpm para retirada das

células bacterianas. O sobrenadante também foi filtrado sob pressão a vácuo em sistema de filtração (CORNING) composto por membranas de poliestireno (PES) com poros de 0,22µm e armazenado a 4°C.

4.5.2 Preparação do extrato bruto

Foram gerados extratos originados das células precipitadas após a centrifugação e do sobrenadante separado.

As células obtidas a partir da centrifugação foram transferidas para potes de vidro pequenos, nos quais foi adicionado 2mL de metanol (MeOH) para rompimento das células e liberação de seus componentes intracelulares e deixado a temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, este material foi centrifugado, o sobrenadante foi coletado e neste, adicionou-se mais 2mL de metanol deixou-se reagindo por mais 24 h. Ao final da reação, o sobrenadante foi centrifugado novamente e filtrado com membranas Millipore de 0,22µm e levado a estufa de secagem para evaporação do solvente a 35-40°C.

Ao líquido metabólico recuperado adicionou-se 3% de MeOH e submeteu-se a uma coluna de SPE/C18 (Stracta) de acordo com as orientações do fabricante. A vazão dos líquidos ocorreu sob pressão a vácuo.

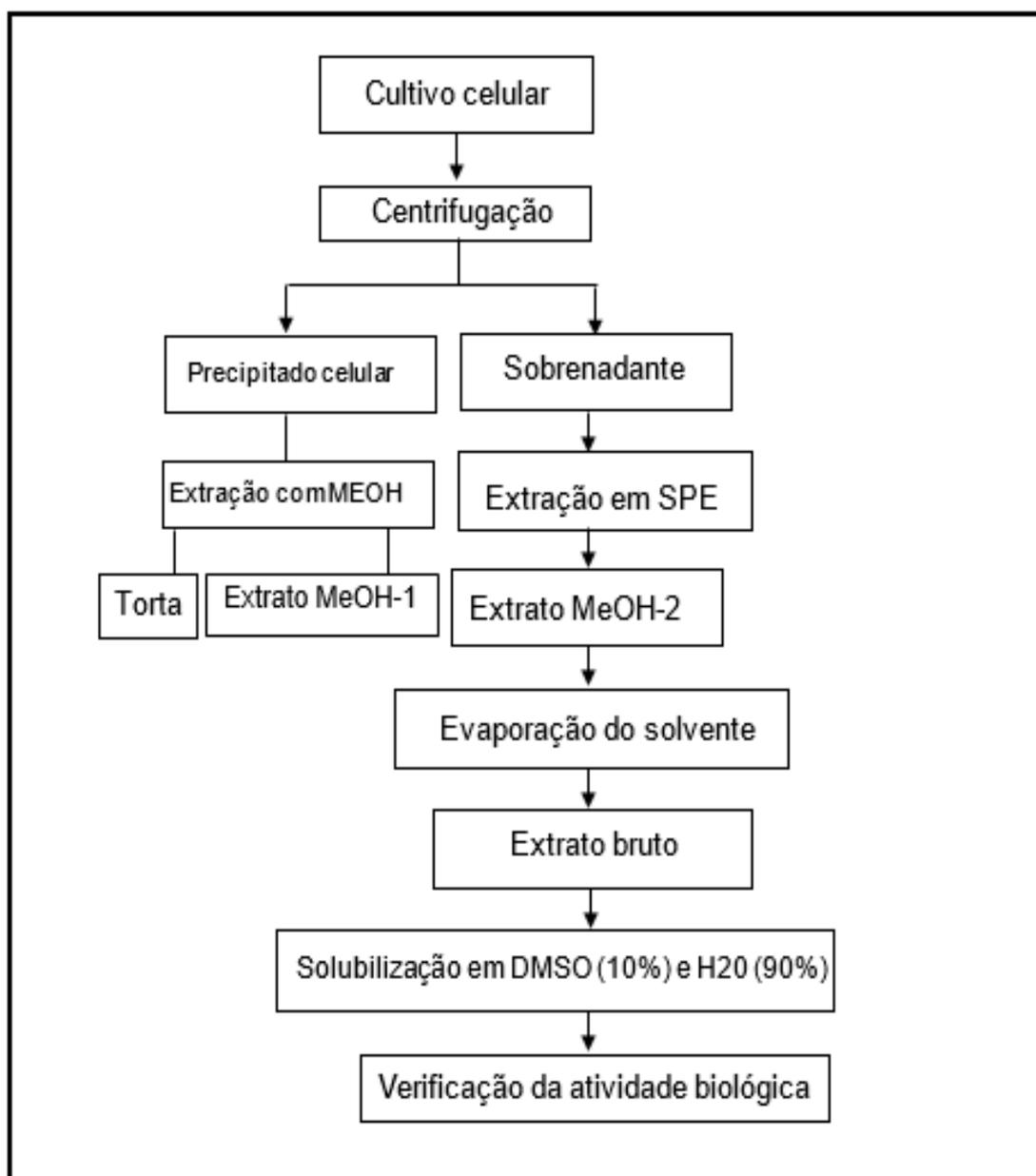
O material concentrado foi colocado em vidros e vedado com papel de filtro. Para secagem primeiramente deixou-se os vidros a temperatura ambiente para evaporação do excesso do solvente, depois sob fluxo de N₂ (nitrogênio) e por último estes foram inseridos em um dessecador contendo sílica para absorção da umidade restante.

4.6 SELEÇÃO DA LINHAGEM ENDOFÍTICA PRODUTORA DE MOLÉCULA ATIVA CONTRA *C. albicans*

A atividade da molécula antimicrobiana contida nos extratos obtidos a partir das linhagens endofíticas foi verificada através do teste de difusão em ágar (BAUER, et al., 1966) descrito no item 4.8.2. A partir dos resultados observados a linhagem 229 foi selecionada para o prosseguimento do objetivo geral deste trabalho que era encontrar um microrganismo que inibisse o crescimento da levedura *C. albicans*. Assim, realizou-se novamente o cultivo como descrito nos itens anteriores e utilizando-se somente o meio de cultura

ISP2, no qual observou-se a melhor inibição dos patógenos avaliados em relação ao meio de cultura sabouraud.

Todo o procedimento realizado seguiu conforme o seguinte organograma do processo de obtenção de extratos com atividade antagônica a *C. albicans* produzidos pela bactéria 229:



4.7 PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA

Realizou-se uma cromatografia em coluna aberta, para pré- purificar a (s) molécula (s) bioativa (s) da mistura e também uma cromatografia de camada delgada (CCD) para visualização do nível alcançado de pureza da (s) substância (s) produzida (s).

4.7.1 Cromatografia em coluna

O extrato metanólico foi fracionado em coluna cromatográfica de vidro previamente empacotada com 48g de sílica gel fase normal (60- 200 μ m) umedecida com acetato de etila e metanol (7:3; v/v). Para esse fracionamento, foi utilizada a mistura seca de 1.200g do extrato bruto com 13,2 g de sílica homogeneizada previamente com metanol. Foram utilizados 100mL dos 4 gradientes preparados (6:4, 1:1, 4:6, 2:8, 100; v/v) com os eluentes acetato de etila e metanol na coluna. Essas frações foram levadas para secagem como acima descrito e utilizada no teste de difusão em ágar para verificação de sua atividade. O fluxo dos gradientes ocorreu com o auxílio de uma bomba a vácuo e a análise foi realizada em capela de exaustão de gases.

4.7.2 Cromatografia de camada delgada (CCD)

O extrato metanólico, obtido conforme descrito anteriormente, foi submetido a um fracionamento em placas de sílica gel 5 x 1,5 (com indicador de fluorescência UV 254 nm).

Para o fracionamento dos extratos utilizou-se como fase móvel os solventes acetato de etila (AcOEt) e metanol (1:1; v/v) para separação das substâncias.

O extrato foi solubilizado com metanol e inserido com capilar de vidro na demarcação inicial da placa que foi adicionada a uma cuba previamente saturada.

A revelação da placa foi feita em revelador fluorescente (254 nm) e com um composto das soluções ácidas vanilina A e B para visualização das substâncias não reveladas em luz ultravioleta (UV) que poderiam fazer parte do extrato. Após a aplicação desta solução, a placa foi adicionada em chapa quente

elétrica para secagem e posterior manuseio e avaliação da migração diferencial das substâncias.

4.8 BIOENSAIOS COM O EXTRATO BRUTO OBTIDO

4.8.1 Teste de avaliação da concentração mínima inibitória (CIM)

Para verificação da menor concentração do extrato com potencial para inibir *C. albicans* utilizou-se o teste de Concentração Mínima Inibitória (ELLOF, 1998), muito utilizado na pesquisa de novos antimicrobianos por apresentar boa sensibilidade, ser barato devido a quantidade mínima de reagentes utilizados, possuir maior reprodutibilidade e apresentar com isso maior confiabilidade dos resultados (OSTROSKY *et al*, 2008).

Na efetivação deste bioensaio primeiramente fez-se a reativação dos microrganismos- teste em placas contendo os meios sólidos adequados através da técnica de esgotamento em estrias cruzadas que foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C. Destas placas retirou-se com o auxílio de uma alça de platina uma colônia do patógeno transferindo-a para um tubo com tampa contendo 5 mL do meio líquido sabouraud a ser incubado a 30°C sob rotação de 150 rpm's por 24 h. A partir desse cultivo, fez-se a diluição correspondente o nível 1 da escala de McFaland para bactérias e nível 5 para leveduras a partir da leitura da densidade de crescimento (OD) dos microrganismos, em espectrofotômetro em 600nm.

Para montagem do experimento utilizou-se microplacas com fundo em U estéreis com tampa e em cada poço designado para teste do extrato adicionou-se 100uL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) para bactérias e sabouraud para fungos (todos na concentração dobrada) 100uL da amostra e 10uL do patógeno em triplicata. Para o controle negativo adicionou-se 100ul do meio, 100uL do solvente utilizado (DMSO e H2O) e 10uL do patógeno. Para o controle positivo 100uL do meio, 100uL de solução antifúngica ou antibiótica e 10uL do patógeno.

Após o preenchimento, as placas foram incubadas em BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) a 30°C por 24h e após esse período adicionou-se 10uL de reagentes reveladores. Para bactérias utilizou-se solução aquosa de CTT (Triphenyltetrazolium chloride- Trifenil de tretazólico) a 1 % e para leveduras utilizou-se o NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride- Nitroazul de Tretazólico) na

concentração de 1%. A atividade antimicrobiana foi verificada diante conforme a mudança de coloração dos poços na presença do revelador.

Os extratos a serem testados foram solubilizados na concentração de 2mg/mL¹. Para prepará-los pesou-se 4,0 mg do extrato seco, adicionou-se 10% de DMSO (Dimetilsufóxido- p/v) correspondente a 200uL, agitou-se vigorosamente até a sua completa diluição e completou-se o volume (2mL) com água destilada estéril.

A concentração mínima inibitória dos extratos que apresentaram resultado bactericida ou bacteriostático também foram realizada em microplacas. Nos três primeiros poços foram adicionados 100ul do meio de cultura (em concentração dobrada), 100uL do extrato diluído, homogenizou-se com a pipeta e transferiu-se de forma sucessiva 100uL para os poços abaixo e no último poço descartou-se 100uL. Por último adicionou-se 10uL da suspensão do patógeno a ser analisado. Os mesmos procedimentos foram utilizados para o controle positivo e negativo. Para o controle positivo foi utilizado o fluconazol na concentração 2mg/mL¹ e para o controle negativo a mistura dos solventes dos extratos (DMSO e H₂O). A placa preparada foi incubada em BOD por 24h a há 36°C e posteriormente adicionou-se as soluções reveladoras, incubou-se por 30 min e fez-se o registro fotográfico das placas.

4.8.2 Teste de difusão em ágar

Para a realização deste teste, seguiu-se as recomendações estabelecidas em norma do CLSI (Instituto de Manuais Clínicos e Padrões Laboratriais) /ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária com pequenas modificações. Desta maneira, os microrganismos patogênicos utilizados (*C. albicans*, *S. aureus*, *M. smegmatis* e *P. aeruginosa*) foram cultivados em tubos contendo meio LB (Luria Bertani) líquido e incubados a 30°C sob rotação a 150 rpm. Deste cultivo retirou-se alíquotas para ajuste da densidade de crescimento (O.D.) do inóculo entre 0,08 a 0,1UFC (Unidade Formadora de Colônia) /mL o que corresponde ao número de turvação 0,5 (1,5x10⁸ UFC/mL) da escala de McFaland conforme norma regulamentadora (M2-A8-Vol. 23, n^o1).

A semeadura dos inóculos preparados foi realizada introduzindo-se um *swab* estéril na suspensão bacteriana ajustada, comprimindo-ocontra a parede interna do tubo para retirar o excesso do inóculo e semeando-se a

superfície das placas contendo o ágar Mueller-Hinton em três direções diferentes. A partir desse procedimento perfurou-se o ágar com ponteiros estéreis, esvaziando-se os furos para adição de 100uL do extrato bacteriano diluído a 2mg/mL e dos controles positivo (fluconazol a 2mg/mL) e negativo (solução contendo 10% de DMSO e H₂O destilada) e incubou-se as placas a 30°C por 24 h.

A sensibilidade do organismo-teste foi determinada através da presença de um halo de inibição formado em torno da cavidade perfurada. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em mm com auxílio de régua. Este teste foi realizado em triplicata, calculando-se ao final a média do diâmetro dos halos.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das inibições obtidas foram analisados com delineamento inteiramente casualizado. Os dados referentes ao tamanho (em mm) dos halos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) realizados com auxílio do software *Assistat 7.7 beta* (Universidade Federal de Campina Grande, Brasil).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO PRIMÁRIA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todas as seis colônias endofíticas foram reativadas nos dois meios de cultura selecionados e a partir da verificação da viabilidade das mesmas, fez-se o teste de atividade antagonista frente a *C. albicans* e outras bactérias patogênicas. Estas análises foram realizadas de modo sucessivo, tendo-se em vista a necessidade de observação e confirmação frequente da viabilidade das culturas. Numa primeira análise, demonstrada na Tabela 5, foram utilizados três desses microrganismos patogênicos e numa posterior análise quatro, sendo eles a *C. albicans*, *S. aureus*, *M. smegmatis* e *P. aeruginosa*.

Neste procedimento, o meio ISP2 foi o que possibilitou melhores condições da produção da molécula inibidora pelos microrganismos endofíticos, uma vez que as zonas de inibição observadas nesse meio foram maiores.

Conforme Sanchez e Demain (2002), a fonte de carbono pode interferir na produção de antibiótico através de enzimas biosintéticas, fato que pode estar relacionado com os melhores resultados de inibição no meio ISP2 por possuir 4% de glicose em relação ao meio Saboraud que contém 40%, além de ter amido como fonte de carbono. Salomani *et al.* (2012), ao fazer um estudo da atividade antimicrobiana de um isolado de *Streptomyces* também verificou os melhores resultados de inibição neste meio, o que nos leva a considerar a importância da disponibilidade da fonte de carbono independente da espécie a ser cultivada.

Tabela 5. Resultado da inibição das bactérias endofíticas frente a *C. albicans* e bactérias de patogênicas utilizando os meios de cultivo ISP2 e sabouraud.

Linhagem	<i>S. aureus</i>		<i>M. smegmatis</i>		<i>C. albicans</i>	
	ISP2	Sab.	ISP2	Sab.	ISP2	Sab.
39	-	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-
73	-	-	+	+	-	-
74	+	+	+	+	-	-
164	+	+	+	+	-	-
229	+	+	-	+	-	+

Na média geral dos resultados e comparando-se a afinidade das linhagens pelos meios de cultura utilizados para produção da substância antimicrobiana, todas as bactérias endofíticas apresentaram pelo menos um princípio de atividade positiva referente a inibição do patógenos testados.

A linhagem 229 foi a única a inibir o crescimento da levedura *C. albicans* (Figura 4 e 5), o que determinou a escolha desta linhagem para os procedimentos posteriores. As demais linhagens inibiram o crescimento de pelo menos dois dos quatro patógenos testados como pode ser visto na Tabela 5 e observado nos apêndices B e C, referentes aos testes de estrias pareadas realizados nos meios de cultura ISP2 e sabouraud. A linhagem 39 foi única a apresentar inibição a bactéria *P. aeruginosa* (Apêndice A) e a 229, além de inibir a levedura de interesse, também apresentou antagonismo a bactéria patogênica *S. aureus*.

A medida que os testes de inibição foram repetidos, as linhagens foram apresentando diminuição na zona de inibição observada em comparação a análise inicial. Esta característica surge provavelmente devido mutações secundárias que não contribuem para aumentar a produtividade da biomolécula ou por condições adversas como gradientes bruscos de pH, temperatura, e por condições de estocagem das células (CARBONARO, 2014).

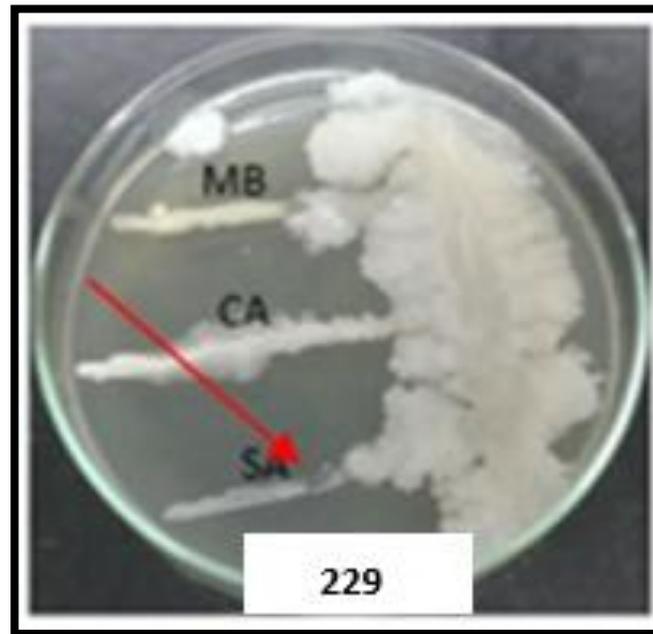


Figura 4: Teste de estrias pareadas realizado com a bactéria 229, no meio ISP2 onde pode-se observar zonas de inibição da levedura *C. albicans* e da bactéria *S. aureus*.

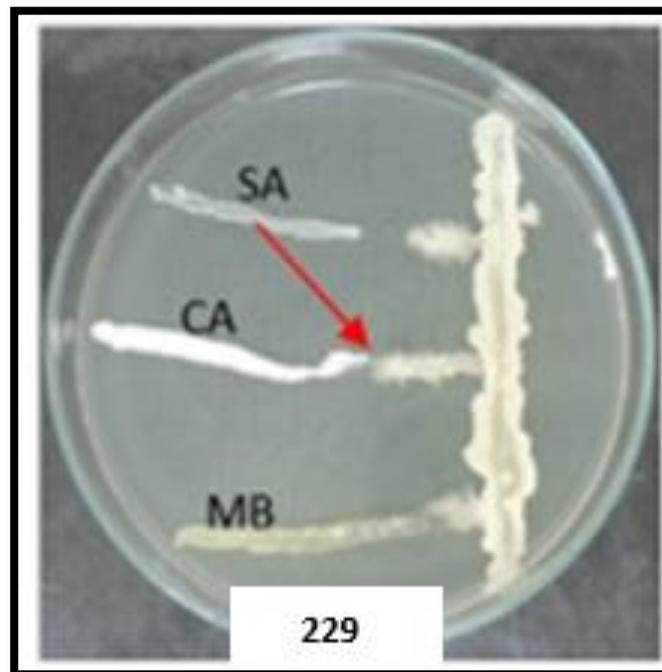


Figura 5: Teste de estrias pareadas realizado com a bactéria 229, no meio sabouraud onde é possível observar zonas de inibição da levedura *C. albicans*.

A detecção de antagonismo em um grande número de microrganismo isolados é bastante facilitada pelo teste aplicado, tendo em vista a economia e a rapidez para se obter resultados, sendo aplicado em fungo e bactérias. Cunha-Lima e colaboradores (2010), ao utilizar o mesmo método de análise para avaliar o potencial de antagonismos contra *C. albicans* de bactérias endofíticas isoladas de plantas arbóreas da Floresta Amazônica também encontrou resultados significativos para microparasitismo e antibiose.

5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS CEPAS BACTERIANAS COM PRINCÍPIO BIOATIVO

Todas as linhagens estudadas foram submetidas a coloração de Gram. O resultado desta análise indicou que a morfologia dos microrganismos avaliados apresenta a mesma forma, registrada como bastonete Gram positivo como mostrado na Figura 6.

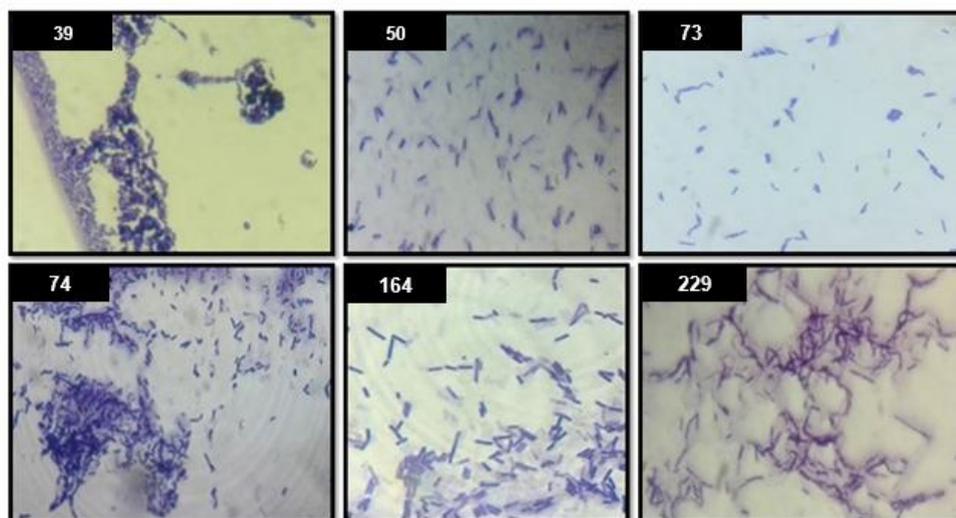


Figura 6: Resultado da coloração de Gram realizada para caracterização morfológica das cepas com atividade antagonista.

A visualização e foto-documentação da linhagem 39 indicou contaminação, sendo encontrados células similares às de levedura em conjunto com bastonetes Gram positivo enquanto que as demais apresentaram-se puras.

As cinco linhagens que apresentaram atividade antagonista na triagem inicial por estrias pareadas, foram utilizadas para extração de DNA cromossomal e o resultado é mostrado na Figura 7.

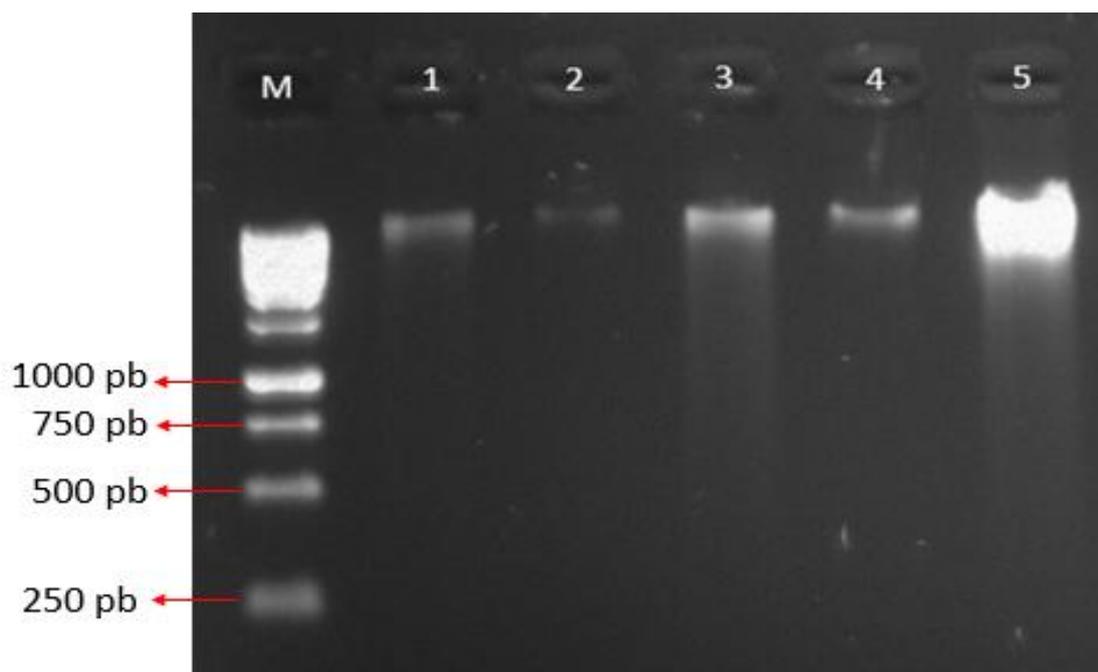


Figura 7: Perfil eletroforético do DNA cromossomal das bactérias produtoras de biomoléculas. M-marcador, 1- 50, 2- 73, 3- 74, 4- 164, 5- 229.

O DNA total obtido seguiu para amplificação por PCR. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 0,8% por eletroforese. Todas as bandas obtidas encontravam-se no tamanho esperado de 1000pb e sem bandas inespecíficas como verificado na figura 8. Posteriormente o material amplificado foi utilizado para efetuação da reação de sequenciamento.

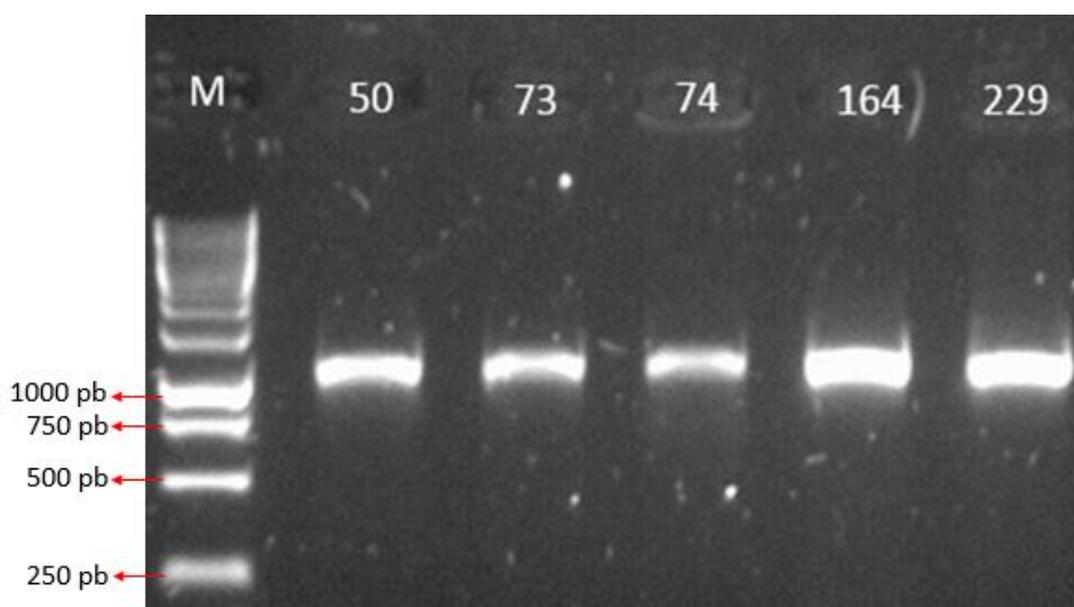


Figura 8: Perfil eletroforético da reação de PCR dos DNA's das bactérias selecionadas.

A identificação molecular é universal no tocante a identificação de microrganismos como bactérias e fungos baseando-se no estudo das sequências do rDNA que mostram a distância filogenética entre grupos de bactérias e de eucaritos, como os fungos. Essa técnica é seguida pela amplificação dos genes de interesse por PCR e posterior caracterização através da análise por eletroforese e/ ou de sequenciamento obtendo-se assim, um perfil da comunidade microbiana (ZILI,2003; SILVA, 2013).

A análise do DNA ribossomal, uma vez extraído e amplificado pode ser utilizado na identificação de diferentes comunidades microbianas em diversos tipos de ambientes, como realizado por Qin et al., (2009) que verificou a diversidade de actinobactérias endofíticas raras associadas com plantas medicinais da floresta tropical em Xishuangbanna verificando a relação taxonômica das espécies encontradas.

A reação de sequenciamento foi realizada com os produtos amplificados e purificados das cepas antagônicas promissoras e tanto o resultado do *score card* quanto dos eletroferogramas apresentaram boa qualidade (Anexo C).

Os scores obtidos pelo BLAST seguiram com valores de *e-value* significativos prevalecendo na identificação taxonômica realizada o gênero *Bacillus* e duas espécies principais (*B. amyloliquefacies* e *B. subtilis*) como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado da análise do sequenciamento do DNA ribossomal região 16S (ss-rDNA) por meio de BLASTn, para cepas bacterianas com atividade anticribiana.

Código	Bactéria identificada	Total Score	E-value	Ident.	Nºde acesso
50	<i>B. amyloliquefacies</i>	15535	0.0	98%	NC_014551.1
73	<i>Bacillus</i> sp. EGD-AK10		0.0	99%	NZ.AVPM1000844.1
74	<i>Bacillus</i> sp. EGD-AK10	17482	0.0	99%	NZ.AVPM1000844.1
164	<i>Bacillus</i> sp. EGD-AK10	15569	0.0	99%	NZ.AVPM1000844.1
229	<i>B. amyloliquefacies</i>	12138	0.0	99%	NC_014551.1

O gênero bacteriano identificado é compatível com o resultado da coloração de Gram aplicada para observação da morfologia das bactérias, uma vez que microrganismos pertencentes a esse gênero são assim caracterizados.

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. destacam-se por apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos podendo produzir substâncias úteis como agente de biocontrole em plantas e no caso da espécie *B. subtilis*, substâncias antifúngicas como os lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (LANNA-FILHO et al., 2009). Cao e colaboradores (2009) por exemplo, encontraram um lipopeptídeo biosurfactante de *B. natto* que exibiu atividades tanto antibacteriana quanto antifúngica.

Estudos relacionados as propriedades antifúngicas e antibacterianas de *B. subtilis* são antigos, datando desde a descoberta da fengicina até a investigação de sua atuação como agente de biocontrole de fungos causadores de deterioração em frutas (VANITTANAKOMT e LOEFFLER, 1986; GUELDNER et al., 1988).

B. amiloliquefaciens, codificada como 229 foi a única que apresentou considerável inibição a *C. albicans*, enquanto as demais apresentaram inibição aos outros microrganismos patogênicos testados. Assim como *B. subtilis*, esta espécie possui a capacidade para produzir uma grande variedade de metabolitos secundários destinadas a suprimir as bactérias e fungos competitivos dentro da rizosfera de plantas entre os quais Bacilisin [L-alanil [2,3-epoxycyclohexanone-4] -L-alanina) ativo contra uma ampla gama de bactérias e contra a levedura *Candida albicans* como especificado no estudo de Chen et al. (2009).

Diversos relatos tem sido realizados referentes a ação antifúngica de espécies do gênero *Bacillus*, inclusive *B. amyloliquefaciens* (HUANG et al., 2010; WANG et al., 2014; YANG et al., 2015).

Lisboa et al. (2006) a partir de isolamento em solo da Mata Atlântica do estado de Santa Catarina, encontrou uma estirpe deste microrganismo capaz de inibir bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras, testando inclusive a estabilidade da molécula em relação ao pH e temperatura.

Zao et al. (2010), isolaram uma linhagem endofítica a partir de hastes saudáveis da planta azevinho (*Ilex latifolia* Thunb) de *B. vallismortis* Z185 em Nanjing, China, que apresentou forte atividade de inibição do crescimento in

vitro contra os fitopatógenos *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* e *Phytophthora capsici*.

Os resultados encontrados neste trabalho coincidem também com alguns relatos na literatura, como por exemplo o estudo de Song et al., (2013), que isolou uma estirpe de *B. amyloliquenfacies* em um manguezal que inibiu um isolado clínico da levedura *C. albicans* verificando por meio de análises de purificação e espectrometria que a molécula encontrada era um lipopeptídeo, ativo contra outras espécies de levedura como *Metschnikowia bicuspidata*, *C. tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*.

5.3 PRODUÇÃO PRELIMINAR DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA E BIOENSAIOS COM O EXTRATO BRUTO OBTIDO

A atividade antagônica dos extratos produzidos nos dois meios de cultura e a partir do sobrenadante e células precipitadas de ambos foi verificada por meio do teste de difusão em ágar. Este teste de antagonismo permitiu que o metabólito secundário produzido pela bactéria endofítica em meio sólido se difundisse no meio de cultura inibindo o crescimento do microrganismo teste formando os halos em volta dos poços, caracterizando a presença da substância antimicrobiana como pode ser observado na figura 9. Também foi verificado a atividade antagônica dos extratos em relação aos microrganismos teste e nos extratos com resultado positivo verificou-se a Dosagem Mínima Inibitória dos mesmos.

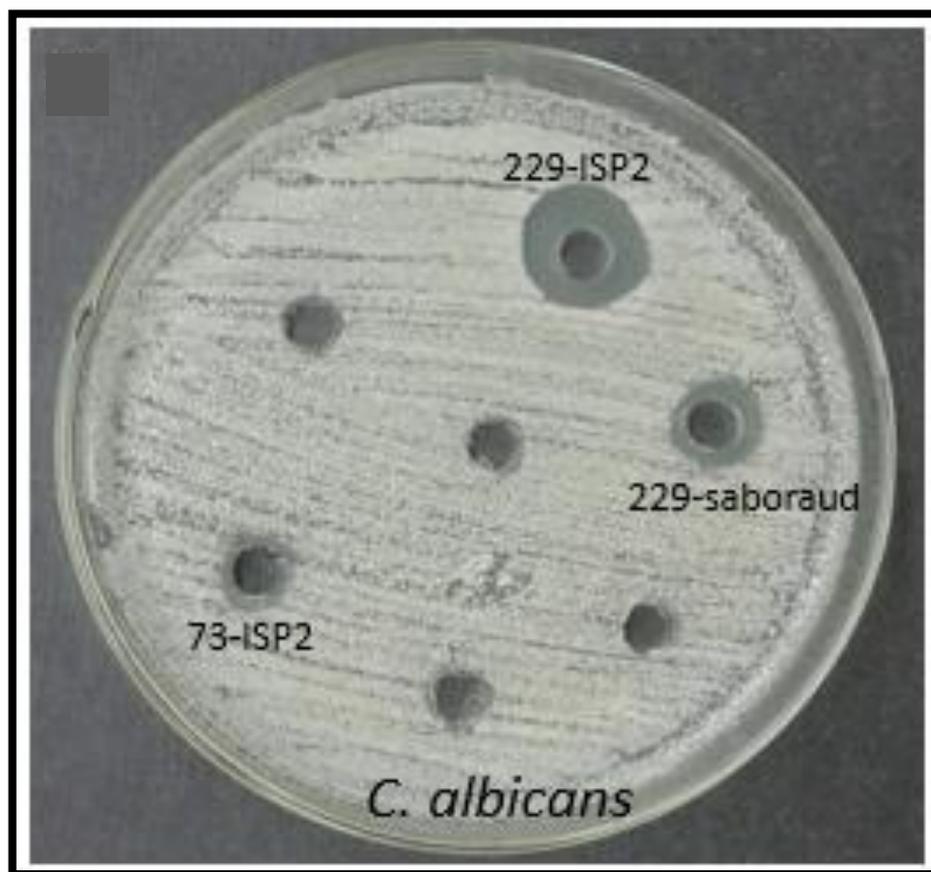


Figura 9: Resultado positivo de inibição da levedura *C. albicans* com primeiro teste de inibição por difusão em ágar aplicado com os extratos produzidos pela bactéria 229 nos meios ISP2 e sabouraud.

O teste de atividade antimicrobiana aplicado, possibilitou a seleção dos extratos ativos no tocante a inibição de *C. albicans* e de outros patógenos e os resultados foram bastante significativos.

Nas placas com a levedura *C. albicans* os dois extratos da bactéria 229 produzidos apresentaram um bom espectro de ação juntamente com o extrato da linhagem 73 produzido no meio de cultura ISP2.

Para quantificar a atividade antifúngica apresentada pelos extratos das linhagens avaliadas solubilizou-se o extrato e fez-se a análise para determinação do CIM (Concentração Mínima Inibitória). Com isso, observou-se que alguns dos extratos apresentavam atividade antagonista aos microrganismos (conforme a Tabela 7), usando-se antibióticos comerciais como controles positivos.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) contra Os patógenos testados dos extratos metanólico das linhagens endofíticas promissoras.

Extrato/meio de cultivo	CIM (Ug.ML ⁻¹)			
	M.smegmatis	S. aureus	P. aeruginosa	C.albicans
39 -Isp2	---	---	---	---
50 -isp2	---	---	---	---
73 - isp2	500	---	1000	---
74 - isp2	500	---	1000	---
164-isp2	---	---	---	---
229 -isp2	---	---	---	---
39 - Sabouraud	---	---	---	---
50- Sabouraud	---	---	---	---
73 - Sabouraud	---	---	---	---
74 - Sabouraud	---	---	---	---
164 - Sabouraud	---	---	1000	---
229- Sabouraud	---	---	---	---
Fração 2	---	---	1000	250
Fração 3	---	---	---	500

--- sem inibição

Para a tentativa de isolar a substância com atividade antagônica a *C. albicans*,deu-se continuidade ao experimento somente com a linhagem 229 por

apresentar o maior halo de inibição a levedura testada e os outros extratos metanólicos obtidos foram armazenados para avaliações futuras.

Desta maneira, produziu-se o extrato bruto da linhagem selecionada novamente, com o qual foi iniciada a etapa de purificação da substância produzida e novos testes de difusão em ágar para verificar a permanência da atividade antimicrobiana anteriormente exibida. A concentração mínima inibitória também foi verificada e os resultados foram descritos na Tabela 4.

5.4 PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA BIOATIVA

A cromatografia aplicada ao extrato produzido resultou em quatro frações separadas a partir dos gradientes aplicados na fase móvel que foram expostas a temperatura ambiente para evaporação dos solventes e completa secagem do extrato cujos rendimentos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Frações obtidas com o fracionamento do extrato bruto produzido pela bactéria 229.

Fração	Massa (g)
F1	----
F2	0,04
F3	0,14
F3	0,19

----- sem massa significativa

O extrato resultante de cada fração separada foi submetido novamente ao teste de difusão em ágar através do qual foi possível identificar atividade antifúngica somente nas frações F2 e F3 através da formação de halo de inibição a *C. albicans* (Figura 10) e aos outros patógenos testados (Apêndice D).

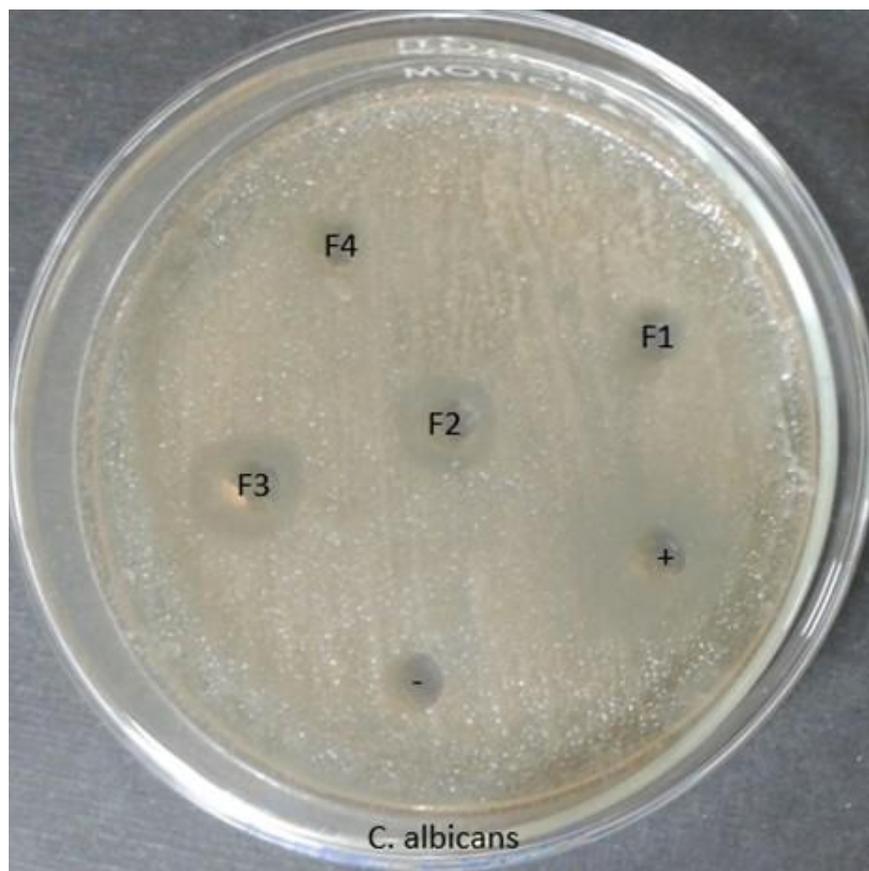


Figura 10: Detecção da atividade antagonista a *C. albicans* em frações obtidas após a aplicação de uma cromatografia em coluna aberta no extrato da bactéria 229.

Em comparação aos halos formados na primeira análise, observou-se a formação de halos menores, porém com uma irrelevante diferença de tamanho que na análise estatística realizada apresentou-se sem diferença significativa conforme a análise pelo teste T $p < 0,05$.

Essa pequena diferença visualizada pode ser resultante das condições de aeração diferente da fermentação realizada anteriormente, o que ocasionou uma menor produção da biomolécula.

Na Figura 11 essa diferença pode ser observada considerando-se a média dos resultados do extrato bruto inicialmente produzido e o extrato purificado ativos contra *C. albicans*.

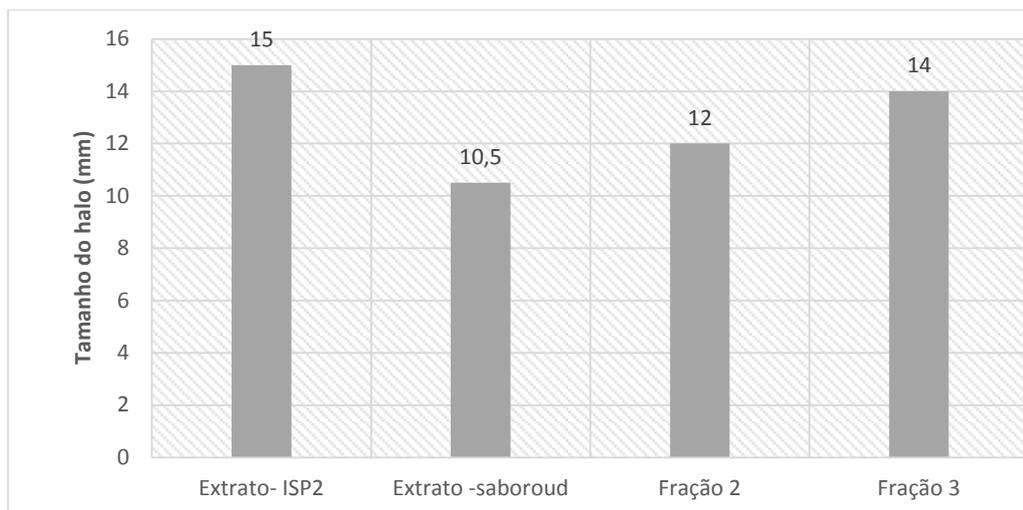


Figura 11. Comparação dos tamanhos dos halos de inibição (mm) a *C. albicans* apresentados pelos extratos brutos e frações purificadas.

Para monitorar a pureza da substância bioativa produzida pelo endofítico pesquisado, fez-se a análise de CCD nas frações ativas resultantes da cromatografia em coluna e a partir da revelação da placa (Figura 12) foi possível identificar bandas separadas com R_f de 1,8 para as duas frações, o que indica presença de moléculas idênticas nas duas frações.

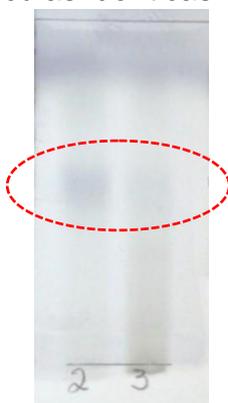


Figura 12. Resultado da Cromatografia em Camada Delgada realizada com as frações ativas após a cromatografia em coluna aberta.

As frações ativas, resultantes da pré-purificação realizada, foram submetidas a análise por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e espectrometria de massas na tentativa de traçar o perfil químico da substância anticandida, porém a análise dos espectros obtidos indicou a necessidade de uma melhor purificação do material produzido.

6 CONCLUSÕES

- A pesquisa substâncias antimicóticas a partir de bactérias existentes no ambiente amazônico culmina com a descoberta de espécies capazes de produzirem moléculas com potencial antimicrobiano capazes de serem introduzidas na indústria farmacêutica.
- O indicativo desta constatação é comprovado nos resultados preliminares desta pesquisa nos quais verificou-se que todas as cepas bacterianas de origem endofíticas estudadas apresentaram capacidade de inibir ao menos um dos quatro microrganismo patogênico testados.
- A identificação das bactérias pela coloração de GRAM indicou que a morfologia de todas as colônias é composta por bastonetes gram positivos, e a identificação taxonômica determinou gênero e espécies conhecido na literatura como produtores de moléculas antimicrobianas.
- Quando cultivadas em meios de cultura diferenciados, as bactérias endofíticas apresentaram as melhores inibições no meio ISP2 através do teste de difusão em ágar.
- A 229, identificada como *B. amyloliquefaciens*, foi a única cepa que produziu molécula anticandida verificada em testes preliminares com a qual realizou-se a produção de extrato que depois do processo de purificação originou frações com CIM de 250 e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de Bactérias Multiresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.18, n.1, 2006.

ANDRIOLI, J. *et al.* Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**. v.31, n.6, p. 300- 304, 2009.

AMERSHAM BIOSCIENCES AB. **Gel filtration: principles and methods**. Uppsala, 2002.

ASSUMPÇÃO, L. C. *et al.* Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. agropec. Bras.**, v.44, n.5, p.503-510, maio 2009.

ALBAGLI, S. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias estratégicas**. v. 12, 2001.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**. V. 43, n.5, p. 319-327, 2007.

AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Microrganismos endofíticos. In: **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 199, 488P.488p, 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, JR W.; PEREIRA, J. O., ARAÚJO L., W. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3 n.1, 2000. ISSN: 0717-3458

BACHIEGA, G.L.; VILEGAS, W.; UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. v. 26, n. 1, p. 29-37, 2005.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24 n.2, 2001.

BARBEDO L. S.; SGARBI, D. B.G. Candidíase DST - **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n.1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, H. R. ; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. São Paulo, Atheneu, 2010, 196 p.

BASTOS, A. M.C. *et al.* Perfil das mulheres com processo inflamatório por *Candida* em resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST. **DST**

Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis, v. 15,n.2, p.26-38, 2003.

BATISTA, J. M; BIRMAN, E. G; CURY, A. E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de paciente com estomatite protética. *Revista de Odontologia*, v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

BÉRDY, J. Bioactivemicrobial metabolites. **The journal of antibiotics**, v. 58,n.1, p. 1–26, 2005.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172,2004 - ISSN: 1518-5192.

BORÉM, A.; GIUDICE, M. **Biotecnologia e meio ambiente**. 2ª ed.: produção independente, 510p., 2008.

BURKE, J.D. *et al.* Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, v.43, n. 4, p. 795-803, 2011.

CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans* RICHARD A. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 55, n.1,p. 1-20,1991.

CANHOS, V.P. ; MANFIO G.P., 2001. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em: http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf. Data do acesso: 15/09/20015.

CARRILO-MUNOZ, A.J.; GIUSIANO,G; EZKURRA, P.A.; QUIDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioterapia**, v.19, n.2,130-139, 2006.

CAO, X.-H. et, al. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* tk-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 373-379, 2009.

CARBONARO, T. M. “**Estudo da estabilidade produtiva de compostos bioativos em linhagem mutante de *Streptomyces clavuligerus***”. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Araraquara- SP, 2014.

CARDOSO, T. S. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans***. Dissertação de mestrado- Universidade de Coimbra. Coimbra, 2013.

CARNEIRO, A. L. B. **Potencial citotóxico e antimicrobiano de plantas da reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus-am.** Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Amazonas. Manaus- AM, 2007.

CARVALHO, F., P. **Avaliação in vitro e in vivo do potencial probiótico de linhagens de Lactobacillus provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra Candida spp.**Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte,2007.

CASTRO, T.L. *et al.* Mecanismos de resistência da *Candida sp wwa* antifúngicos. **Infarma**, v.18, nº 9/10, 2006.

CHAFFIN, W. L.*et al.*Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 62, n. 1, p. 130–180, 1998.

CHAGAS, M. B. O. **Fungos endofíticos de *hancornia speciosa gomes*: identificação e atividade antimicrobiana.** 86p.Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2013.

CHEN, X.H. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens . **Journal of Biotechnology**, v.140, p. 27–37, 2009.

CHISTENSEN, M. J.; Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* e endophytes; **Austalasian Plant Phythology**, v. 25, p.186-191, 1996.

CONTI, R; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos.**Ciência e Cultura**, v. 64, n.3, p. 43-47, 2012.

CUNHA-LIMA, C. Atividade anti-cândida de bactérias endofíticas de plantas arbóreas da Amazônia. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010- ISBN 978-85-89109-06-2.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433 2010.

DELABONA, P. S.**Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico.** Dissertação de mestrado- Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2011.

De ROSSI, T. *et al.*Interações entre *Candidaalbicans*e Hospedeiro, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n.1, p. 15-28, 2011.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-713, 1998.

EMBRAPA 2015, in *Jornal do endofítico*. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introdução.html> > Acesso: 27 de out.de 2015.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **R. bras. Bioci.**, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven- Biologia vegetal**. Guanabara Koogan, 8. ed.- Rio de Janeiro, 2014.

FINKELSTEIN, E; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **Journal of Antimicrobial agents**, p. 189-194, 1995.

FALCÃO, A. F. P.; SANTOS, L. B.; SAMPAIO, N.M. Candidiase associada a próteses dentárias. **Sitientibus**, n. 30, p. 135-146, 2004.

FRANÇA; J. C. B.; RIBEIRO C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.1, p.23-28, 2008.

GIL-BONA, A. *et al.* *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. **Jounal Proteomics**, v.8, n.127, p. 340–351,2015.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratório**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GUELDNER, RICHARD C. *et al.* Isolation and Identification of Iturins as Antifungal Peptides in Biological Control of Peach Brown Rot with *Bacillus subtilis*. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, p. 366-370, 1988.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE. S.; LEE, K.; BERG J. V.; HU, J, MESSER,S. HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. **Mortality of Candida Bloodstream Infection**, v.37, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, M. T. Abiótico: importância terapêutica para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, p. 667-669, 2010.

HARLEY, J. P. 2005.**Laboratory exercises in microbiology**.6^a ed. New York: Mac Graw- Hill Companies. 466 p.

HAWSWORTH, D.L. The biodiversity of microorganisms and invertebrates:its role in sustainable agriculture. Wallingforf:C.A.B. Internacional, 1991.

HOLANDA, A. A. R. **Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal cocomitante**. 58p. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Natal, Natal- RN, 2007.

JAWETZ, E. 1998. **Microbiologia médica**. 20^a Ed. São Paulo: Hamburg.524 p.

KOUR, A. *et al.* Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World J MicrobiolBiotechnol**, 24: 1115-1121, 2008.

LACAZ, C. da S.; PORTO, E.& MARTINS, J.E.C – **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. ver. E ampl. São Paulo, Sarvier, 1991. 695 p.

LANÇAS, F.M. Extração em Fase Sólida (SPE). Rima, São Carlos (2004).

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica**, v. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LISBOA, *et al.* Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **MICROBIOLOGY**, v. 9, p.111-118, 2006.

LIU, B.*et al.* Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4.**Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 98, p. 305-311, 2010.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 670-673, 2004.

MACEDO, A. N. Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino. 113 páginas. Dissertação de mestrado- Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**.12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARELLA, S. Bacterial Endophytes in Sustainable Crop Production: Applications, Recent Developments and Challenges Ahead. **International Journal of Life Sciences Research**. v. 2, n.2, p.46-56, 2014.

MARDH, P.A. *et al.* Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. **Int J STD AIDS**, v. 13, p. 522-39, 2002.

MATOS, F. J. A; Introdução á fitoquímica experimental. **Edições UFC**, 3. Ed, 2009.

MAYER *et al.*, Purification of Clavulanic Acid by Ion-Pairing Systems. **Bioseparation**, v.6, p.25-39, 1996.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms Virulence, v. 4, n.2:119–128, 2003.

MEZZARI, A.; CADURO, P. **Micologia no laboratório**. Sagra-DC Luzzatto, São Paulo. 123p., 1996.

MÍMICA, L. *et al.* Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 45, n.1 p. 17-23, fevereiro 2009.

MORAIS, L. P. **Antagonismo de bactérias endofíticas amazônicas a diferentes bactérias**. Manaus,. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, 2004.

NAVARRO-GARCIA, F; SANCHEZ, M. N. C.; PLA, J. **Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans***, 2000.

NOBRE M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. **Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.1, p.175-184, 2002. ISSN 0103-8478.

NORONHA, M.C. **Geoespaço: espaço geográfico do Amazonas**. Cecil concorde, 2003. 280p.

OLIVEIRA, J. C. Candidíase (Monilíase). In **Tópicos em micologia médica**. 4^a Ed. Rio de Janeiro: editora. 230 p., 2014.

OLIVEIRA, F. B.M. *et al.* Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. *Revista Interdisciplinar. NOVAFAPI*, v.4, n.4, p.72-77, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO T. M.; NISHIKAWA S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, n.2, p. 301-307, 2008.

PAN, S.Y.; PAN, S.; YU, Z.L.; MA, D.L.; CHEN, S.B.; FONG, W.F.; HAN, Y.F.; KO, K.M. New Perspectives on Innovative Drug Discovery: An Overview. **Journal of Pharmacia Pharmaceut Sci** (www.cspsCanada.org), v.13, n.3, p. 450 - 471, 2010.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. *Candidíase*. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, V.8, n.2, p.75-82, 2014.

PEIXOTO, J.C.C.; LEOMIL, L.; SOUZA, J.V.; PEIXOTO, F.B.S.; ASTOLFI-FILHO, S. **Comparison of bacterial communities in the Solimões and Negro River tributaries of the Amazon River based on small subunit rRNA gene sequences**. *Genetics and Molecular Research*, v.10, n.4, p. 3783-3793, 2011.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clinical Microbiology**.v.20, n.1, p. 133-163, 2007.

PESSOA Jr, A. Cromatografia de troca iônica In: **Purificação de produtos biotecnológicos**, Manole, Barueri-SP 2005, Cap. 8, p. 176-195.

PINTO, A. C.et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.**Química Nova**, V. 25, p. 45-61. 2002.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 457–473, 2011.

QIN, et al. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna. **Applied and environmental microbiology**, p. 6176–6186, 2009.

QUINTÃO, T. **Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)**. In___ Actas de bioquímica: temas e sessões internas, Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, 5: 97-109,1991.

RATTI, R. P. **Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por Streptomyces tubercidicus, endofítico isolado de Solanum lycocarpum St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos-SP**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA N. A. **Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico**. Química Nova, v. 30, n. 4, p.1026-1031, 2007

RIBEIRO, E. L.; CARDOSO, C. G.; INÁCIO, M. M. Prevalência e formação de tubos germinativos por isolados de *Candida albicans* oriundos de indivíduos sem DST com e sem candidíase peniana. **Journal Health Sci Inst**.v.32, n.4, p. 353-6, 2014.

SANGER F & COULSON, A R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol**, v.94, n.3, p. 441–448, 1975.

SANTOS, C. D. S. M. **Visão de futuro para produção de antibióticos: tendências de pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2014.

SANCHEZ, S.; DEMAİN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes Enzyme and Microbial. **Technology**, v.31, p. 895–906, 2002.

SALAMONI, S. P.; GERMANI, J. C.; SAND, V. D.; Teresinha S. Estudo de produção de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *streptomyces* sp . 1s. **Evidência**. v. 12 n. 2, p. 175-186, 2012.

SILVA, V.V.; DÍAZ, M.C.; , FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectologia**, v.19, Supl. 2: 149-156, 2002.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero Candida em pacientes transplantados de medula óssea**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, 2011.

SILVA, G. R. **Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de caesalpinia pyramidalis tul. do bioma caatinga**. Dissertação de mestrado(Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2013.

SILVA, N. M. V. **Caracterização taxonômica e atividade antimicrobiana de actinomicetos associados a líquens folhosos de ecossistemas amazônicos**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, 2008.

SILVA, J. M. C; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. The Fate of the Amazonian Areas of Endemism. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p. 689–694, 2005.

SIDRIM, J. J.C; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**.1. ed., São Paulo, Guanabara Koogan, 2004. 408 p.

SIQUEIRA JR, J. F.; SEN, B H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Medicine Oral Pathol Oral Radiol Endod**, n.97, p. 632-41, 2004.

SONG B.; RONG, Y-J.; ZHAO, M.-X.; CHI, Z.-M. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. **Microbiol Biotechnol**, v.97, p.7141–7150, 2013.

SOUZA , A.Q L.et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora*(aubl.) rich e *Strychnoscogensbentham*. **Revista Acta Amazônica**, v. 34 (2), p. 185 – 195, 2004.

STEFANI, R.; NASCIMENTO, P.G.B.D. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas com auxílio de computador: evoluções recentes. **Química Nova**, v. 30, n.5, 1347-1356, 2007.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endo- phytes and their natural products**. Microbiology and Molecular Biology, v. 67 n. 4, p. 491–502, 2003.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candidas* sp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.1, p.91-93, 2007.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2009.

TEIXEIRA, M. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. B. 2013. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**. 1ª ed. Amazonas: EDUA .205p.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, 616-623, 2002.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, 2003.

VALLE, G. C. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário, **NewsLabeled**, v.101, p. 204- 208, 2010.

VANITTANAKOM, N., LOEFFLER, W., KOCH, U., & JUNG, G. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of antibiotics**, v.39, n.7, p. 888-901, 1986.

VISENTIN, M. A. D. R. Amazônia: a exploração sustentável da diversidade biológica. **Cadernos de Direito**, v.11, n.20, p.101-110, 2011.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000.

WANG, Z. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformes* HS10. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 454, p. 48-52, 2014.

WEINDL, G.; WAGENER, J. SCHALLER, M. *Epithelial Cells and Innate Antifungal Defense*. **Journal of Dental Research**, v.89, n.7. P. 666-675, 2010.

WILLIAMS, D.H. *et al.* Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v. 52, n.6, p. 1189 -1208, 1989.

YANG, L. *et al.* Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. **Biological Control**, n. 85, p. 52-58, 2015.

YONAMINE, P. H.; SILVA, C. S.; PASOTTO, M. B. Comparação direta entre resinas cromatográficas na purificação do ácido clavulânico. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.**

YU, H. *et al.* Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, n. 165, p. 437—449, 2010.

ZHAO, Z. *et al.* Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 292-297, 2010.

ZILLI, É. J. *et al.* Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

8 ANEXOS

ANEXO A- Meios de cultura utilizados

Foram utilizados meios de cultura no estado líquido e sólido. Para o preparo dos meios de cultura no estado líquido, retirou-se o ágar bacteriológico da composição.

Uma vez pesados, os componentes de cada meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

A1- Ágar Extrato de malte e levedura (ISP2) / pH 7,2

Extrato de levedura	4g
Extrato de malte	10g
Dextrose	4g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

A2- Ágar saboraud /pH 5,6

Peptona	4g
Dextrose	40g
Ágar	15g
Água destilada.....	1000mL

A3- Ágar Mueller Hinton/ pH 7.3 ± 0.2

38g	1000mL
-----------	--------

A4- Agar de infusão de cérebro e coração/ pH 7.4 ± 0.2

52g.....	1000mL
----------	--------

ANEXO B- soluções**B1- Vanilina ácida**

Pesou-se 15g de vanilina e dissolveu-se em 250mL de etanol a 0°C e em seguida adicionou-se lentamente 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado.

B2- Solução tampão TEB 10X (solução mãe)

Tris base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA	3,35g
Água destilada	1000mL

Pesou-se os reagentes, regulou-se o pH para 8,0/8,5 e preparou-se as frações de TEB 1X diluindo-se 100mL da solução mãe em 900mL de água destilada e transferindo-se as ambas as soluções para garrafas âmbar.

B3- Gel de agarose a 0,8%

Agarose	0.5g
TEB 1X	50mL
EtBr (Btometo de etidio)	0,2uL

Pesou-se a agarose, adicionou-se a solução e TEB 1X e levou-se ao microondas para derretimento. Deixou-se esfriar e inseriu-se à solução de EtBr com o auxílio de uma pipeta automática.

ANEXO C- Qualidade das sequências das bactérias endofíticas após submissão no programa BLAST

> 100 bases
 > 200 bases
 > 250 bases
 > 300 bases
 > 350 bases
 > 400 bases

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input checked="" type="checkbox"/> 2_B01F.ab1	955	792 (83%)	737 (77%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 13_15Jul_C2_E08R_14_StdSeq50_POP7xl_1.ab1	994	841 (85%)	795 (80%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 10_15Jul_C2_B08R_05_StdSeq50_POP7xl_1.ab1	1006	609 (61%)	566 (56%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 3_C01F.ab1	966	778 (81%)	731 (76%)		Ok
<input type="checkbox"/> 09_15Jul_C2_A08R_02_StdSeq50_POP7xl_1.ab1	1061	21 (2%)	2 (0%)		No
<input checked="" type="checkbox"/> 5_E01F.ab1	982	592 (60%)	535 (54%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 12_15Jul_C2_D08R_11_StdSeq50_POP7xl_1.ab1	995	845 (85%)	795 (80%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 4_D01F.ab1	938	768 (82%)	724 (77%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 1_A01F.ab1	962	786 (82%)	738 (77%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 11_15Jul_C2_C08R_08_StdSeq50_POP7xl_1.ab1	1005	844 (84%)	792 (79%)		Ok
Total	9864	6876 (70%)	6415 (65%)		No: 1 Ok: 9

ANEXO D- Contigs formados com as sequências das bactérias endofíticas analisadas

50-

GCCCCGGTGCCACTGAAGACACACAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAA
A GGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGCCTTTCCCGGCTCAACC
GGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAAT TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGAGC GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCC GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAA
CGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAG
GACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGG ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCG
AGGTTAAGCCAATCCCACAAA TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA
ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCCT TGTACCCACCCGCCCGTCACACCCA
CCGAGAGTTTTGTAAACCCCCCGAA AATTCGGGGGGAGGGTAAACCTTT
TTTTTGGGAAACCCCCCGC

73-

GTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCT
GATGTGCCCTCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTC
TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC
AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGGGTGTAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTAAC
CTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACAGATGATTGGGGGGG

74-

AGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGG
GGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
CGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
AGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGT
TCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGGGTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAG
GTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACAGATGATGG

164-

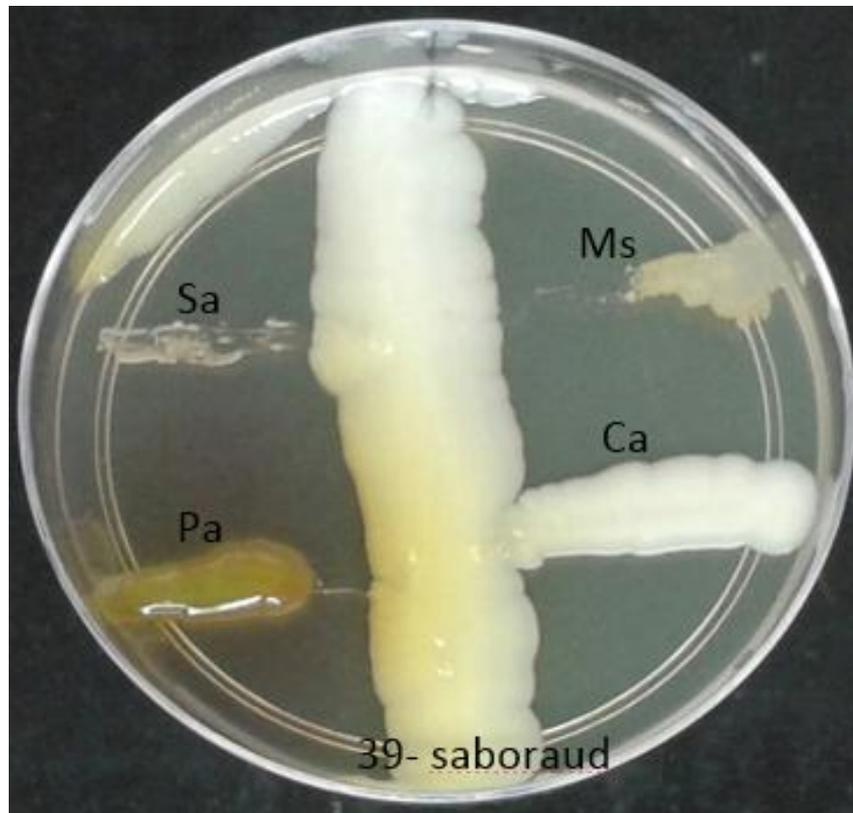
TTGTCCGGTATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTC
AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
CCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAAC
CTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTG

229-

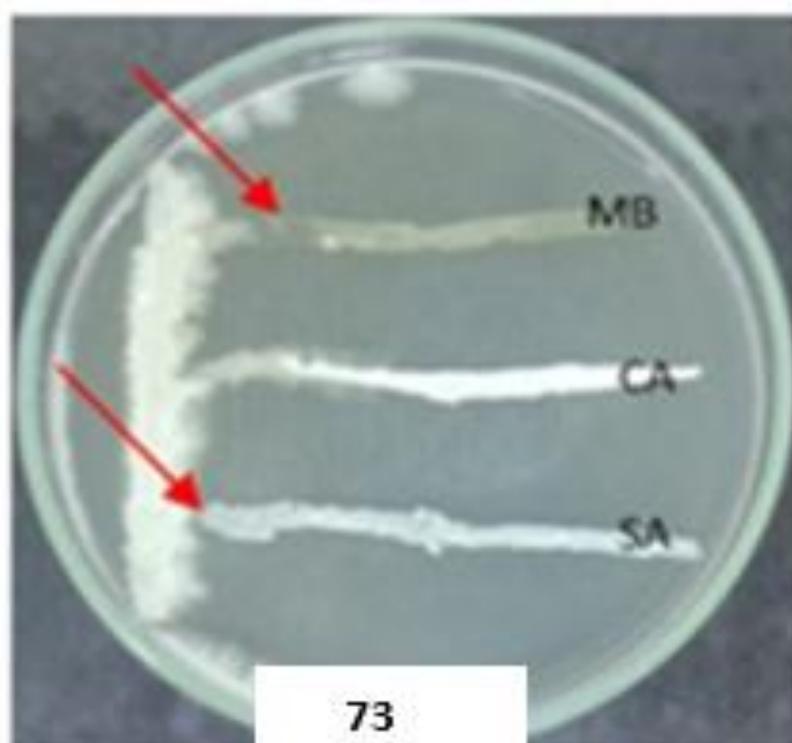
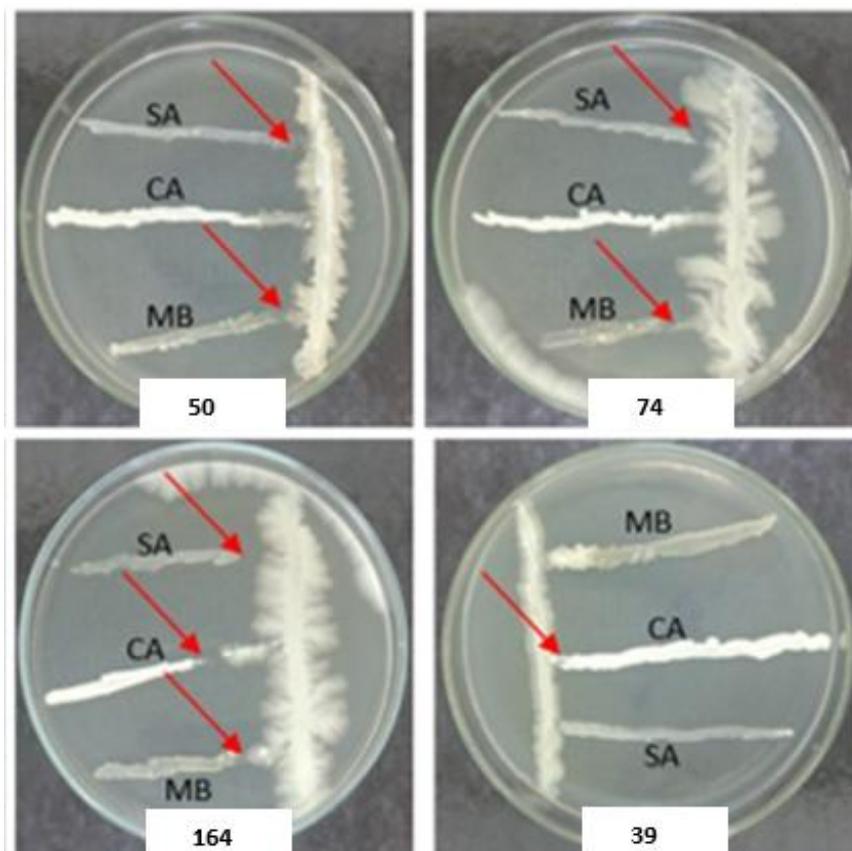
CAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
CGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC
AGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGT
TCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGGGGTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG
GTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAACGGTGGACAGGATGAT

9 APÊNDICES

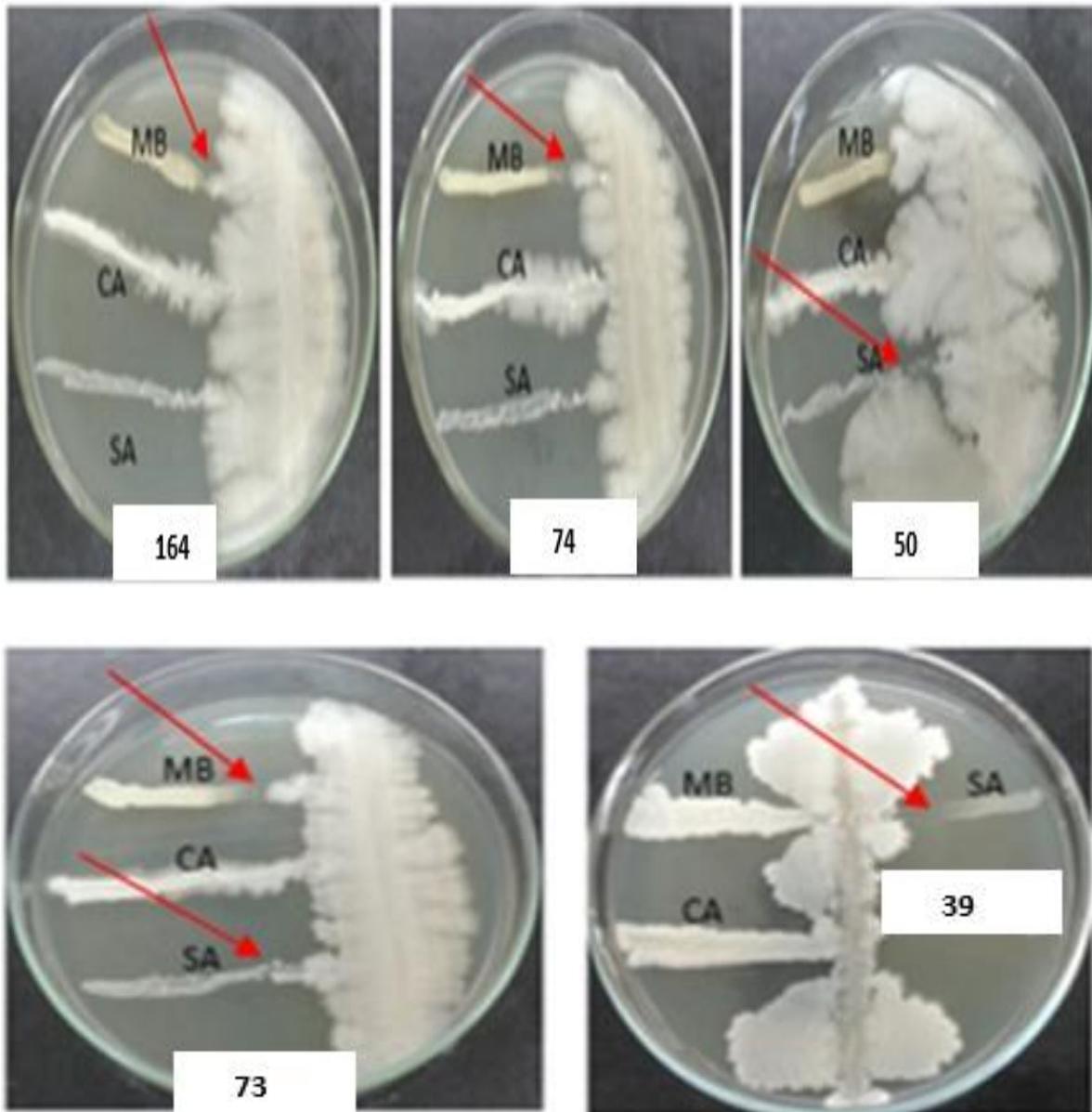
APÊNDICE A- Teste de estrias pareadas realizado com a bactéria 39 no meio Sabouraud onde são observadas zonas de inibição dos patógenos *M. megmatitis* e *P. aeruginosa*



APÊNDICE B- Teste de estrias pareadas realizado com as seis cepas no meio ISP2 onde são observadas zonas de inibição dos patógenos testados.



APÊNDICE C-Teste de estrias pareadas realizado com as seis cepas no meio sabouraud onde são observadas zonas de inibição dos patógenos testados



APÊNDICE D- Fotografia de placas referentes ao primeiro teste de inibição por difusão em ágar com os extratos produzidos pelos microrganismos endofíticos, nas quais são evidenciados os resultados positivos de antagonismo a microrganismos patogênicos: A e B - Presença de halos de inibição apresentado pelo extrato das bactérias 73 e 74 contra dos patógenos *M. smegmatis* e *S. aureus*.

