

Victor Damasceno Pavani

**Estudos metabolômicos entre interações da rizosfera de
Senna spectabilis e rizobactérias associadas**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

P337e Pavani, Victor Damasceno
Estudos metabolômicos entre interações da rizosfera de
Senna spectabilis e rizobactérias associadas /
Victor Damasceno Pavani. – Araraquara : [s.n], 2014
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Ian Castro-Gamboa

Química orgânica. 2. Rizosfera. 3. Espectrometria de
massa. 4. Metabólitos secundários. I. Título.

VICTOR DAMASCENO PAVANI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 21 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Iân Castro Gamboa (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Angela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Flávia Talarico Saia
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Santos

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Victor Damasceno Pavani

Filiação: Luiz Carlos Pavani e Maria do Carmo Morelli Dasmasceno Pavani

Nascimento: 29/09/1987

Endereço profissional

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

Rua Prof. Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, Araraquara/SP, CEP 14800-900

Telefone: (16) 993586664 – victorpavani951@hotmail.com

Formação acadêmica

2012 - 2014

Mestrado em Química pelo Instituto de Química – UNESP/Araraquara.

Título: Estudos Metabolômicos entre interações da rizosfera de *Senna spectabilis* e rizobactérias associadas.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2008 – 2011

Bacharelado em Química – UNESP/Araraquara.

Título: Otimização de métodos para a determinação de antimicrobianos em cama de frango por CLAE-FLU.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mary Rosa Rodrigues de Marchi.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Apresentação de trabalhos

- **PAVANI, V. D.**; CARDOSO, P.; SELEGATO, D. M.; CASTRO-GAMBOA, I. Metabolomic study of rhizobacterias isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- NETTO, P. T.; **PAVANI, V. D.**; ZOCCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. Optimization and validation method for determination of veterinary antimicrobials: occurrence in poultry litter. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em eventos

- 4th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP). METABOLOMIC STUDY OF RHIZOBACTERIA ISOLATED FROM SENNA SPECTABILIS'S RIZHOSPHERE. 2013. (Congresso);
- São Paulo School on Bioorganic Chemistry. 2013. (Outra);
- Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Determinação de antimicrobianos, empregados no manejo avícola, utilizando CLAE-FLU. 2011. (Congresso);
- Congresso Farmacêutico. 2011. (Congresso).

Dedico esse trabalho à minha família,
especialmente aos meus pais, que sempre
me deram força, coragem e apoio.

RESUMO

Atualmente, avançadas tecnologias têm sido desenvolvidas para a exploração de fontes naturais pouco exploradas (exemplo: rizosfera e suas interações microbianas e organismos marinhos), visando novos agentes quimioterapêuticos. Neste trabalho, plântulas de *Senna spectabilis* foram cultivadas em hidroponia, com coleta da microflora da rizosfera realizada em três tempos diferentes de desenvolvimento do vegetal. No total, foi possível o isolamento de 51 bactérias e 129 fungos e, após identificação por filogenia (16S rRNA), encontrou-se, como principais gêneros: *Shigella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudoxanthomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter* e *Rhizobiu*. Foram escolhidas três bactérias, codificadas como CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b, para o estudo cinético bacteriano, visando à relação do crescimento com a produção metabólica. A análise mostrou que as bactérias atingiram a fase estacionária em 40 horas, período em que há produção de metabólitos secundários. Para a caracterização dos metabólitos, as três linhagens foram inoculadas em meio líquido Nutriente à 25 °C, sob agitação e, ao atingir a fase de interesse, foi realizada partição líquido-líquido com acetato de etila. Os extratos foram analisados por espectrometria de massas visando a detecção e caracterização dos metabólitos majoritários. Foi possível detectar 08 compostos e identificar 02. Dentro desse o ácido metropheno e, uma uma série isomérica de amidas e formamidas foram evidenciadas. Adicionalmente, a presença da série foi também confirmada através de uso de uma metodologia de desreplicação preliminar utilizando RMN.

Palavra-chave: *Senna spectabilis*, Rizosfera, *Shigella* sp, Espectrometria de massas

ABSTRACT

Nowadays, advanced technologies are developed for the discovery of unexplored natural sources (e.g. rhizosphere microbial interaction and marine organisms), targeting new chemotherapeutic agents. In this work, *Senna spectabilis*'s seedlings were cultivated in hydroponic environment, and its rhizosphere's microflora collected at three different stages of the plant's development. It was possible to isolate 51 bacterias and 129 fungi and, after identification by phylogenetic (16S rRNA), was determined the main genders, such as *Shigella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudoxanthomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter* and *Rhizobiu*. We chose three of bacterias, coded as CSP-50a, CSP-52b and CSP- 53b, for kinetic's studies, aiming the comparison between the bacteria growth and the production of metabolites. This analysis showed that they reached the stationary phase at an average of 40 hours, when the production of secondary metabolites started. To characterize those metabolites, the three strains were grown on liquid nutrient medium at 25°C under agitation to achieve the phase of interest, followed by liquid-liquid partition with ethyl acetate. Analysis by mass spectrometry was performed aiming the detection and characterization of the major metabolites. It was possible to detect 08 compounds and identify 02. Metrophene acid, as well as an isomeric formamide series were detected. Additionally the formamides were also confirmed by the use of a preliminary methodology using NMR dereplication tool.

Key-words: *Senna spectabilis*, Rizosphere, *Shigela* sp, Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Brasilina, corante extraído do Pau-Brasil.	17
Figura 02: Estrutura química dos hormônios produzidos por plantas.	23
Figura 03: Exemplos de compostos orgânicos e pesticidas	24
Figura 04: Estrutura química de alguns metabólitos secundários de importância produzidos por fungos endofíticos.	26
Figura 05: Curva de crescimento microbiano teórico.	27
Figura 06: Representação das subunidades do ribossomo de procariotos.	31
Figura 07: Ilustração das etapas da reação em cadeia polimerase (PCR).	32
Figura 08: Ilustração do teste de Gram.	33
Figura 09: Imagem da flor, folha e árvore da <i>Senna spectabilis</i> .	35
Figura 10: Metabólitos secundários obtidos de <i>Senna spectabilis</i> .	36
Figura 11: Fluxograma ilustrando o processo de escarificação química.	45
Figura 12: Fluxograma ilustrando o processo germinativo.	45
Figura 13: Fluxograma ilustrando a transferência das plântulas de <i>Senna spectabilis</i> em vasos contendo areia para o sistema hidropônico.	46
Figura 14: Ilustração do isolamento dos micro-organismos rizosférico.	47
Figura 15: Ilustração da metodologia realizada para a curva de crescimento bacteriano.	52
Figura 16: Fluxograma do procedimento de crescimento das bactérias CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b.	53
Figura 17: Placas, nutriente ágar, com dez dias de incubação após serem inoculadas com solução nutritiva coletada das mudas de <i>Senna spectabilis</i> : a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 6; f) vaso 7; g) vaso 8 e h) vaso 9.	58

Figura 18: Placas com Czapek-dox ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de <i>Senna spectabilis</i> : a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 6; f) vaso 7; g) vaso 8 e h) vaso 9.	59
Figura 19: Placas, nutriente ágar, inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de <i>Senna spectabilis</i> : a) controle ar, meio czapek-dox e b) controle ar, meio Nutriente.	60
Figura 20: Placas com nutriente ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de <i>Senna spectabilis</i> : a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 5; f) vaso 6; g) vaso 7 h) vaso 8 e i) vaso 9.	61
Figura 21: Placas com czapek-dox ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de <i>S. spectabilis</i> : a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 5; f) vaso 6; g) vaso 7 h) vaso 8 e i) vaso 9.	62
Figura 22: Placas, nutriente ágar, inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de <i>S. spectabilis</i> : a) controle ar, meio czapek-dox e b) controle ar, meio nutriente.	63
Figura 23: Imagem das colônias das linhagens a) CSP-50a, b) CSP-52b, c) CSP-53b.	64
Figura 24: Imagem em lâmina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-50a.	64
Figura 25: Imagem em lâmina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-52b.	65
Figura 26: Imagem em lâmina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-53b.	65
Figura 27: Produtos da PCR amplificados com o set de <i>primers</i> Ft1(F) e Rd1(R) para as amostras (1 a 3) contendo 3 µL (a) e 5 µL (b) de DNA, C- (controle negativo), M (marcador molecular). *(1500pb).	67

Figura 28: Curvas de crescimento das linhagens A) CSP-50a em Czapek; B) CSP-50a em nutriente; C) CSP-52b em Czapek; D) CSP-52b em Nutriente; E) CSP-53b em Czapek; F) CSP-53b em Nutriente.	69
Figura 29: Perfil cromatografico dos meios sem a inoculação das linhagens de bacteria (Branco).	71
Figura 30: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Czapek, 54 horas (preto) e Nutri, 48 horas (azul).	72
Figura 31: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Czapek, 66 horas (preto), Nutri, 48 horas (azul).	72
Figura 32: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-53b em Czapek, 66 horas (preto), Nutri, 42 horas (azul).	73
Figura 33: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Czapek, com 54 (preto) e 84 horas (azul) de incubação.	74
Figura 34: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Nutriente com 48 (preto) e 84 horas (azul) de incubação.	74
Figura 35: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Czapek com 66 (preto) e 84 horas de incubação (rosa).	75
Figura 36: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Nutriente com 48 (preto) e 84 horas de incubação (rosa).	76
Figura 37: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-53b em Czapek com 66 (preto) e 84 horas de incubação (rosa).	77
Figura 38: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-53b em Nutriente com 42 (preto) e 84 horas de incubação (rosa).	77
Figura 39: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-50a em meio nutriente, a) t_r = 16 minutos, b) t_r = 12 minutos, c) 10,3 minutos.	79
Figura 40: Fragmentação do íon precursor de m/z 267,0673 por ESI-MS. Energia de colisão de 25 eV.	80
Figura 41: Fragmentação do íon precursor de m/z 164,1073 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	80

Figura 42: Fragmentação do íon precursor de m/z 245,1290 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	81
Figura 43: Proposta de fragmentação para os composto de m/z 164.	87
Figura 44: Espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a em meio nutriente.	88
Figura 45: Ampliação da região aromática do espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a em nutriente.de colisão 25 eV.	89
Figura 46: Ampliação da região de hidrogênios desprotegidos do espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a	89
Figura 47: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-52b em meio nutriente, a) t_r = 21 minutos, b) t_r = 10,3 minutos.	91
Figura 48: Fragmentação do íon precursor de m/z 269.2107 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	92
Figura 49: Fragmentação do íon precursor de m/z 217,1330 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV	92
Figura 50: Propostas de fragmentação do composto de m/z 269.	95
Figura 51: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-53b em meio nutriente, a) t_r = 16,7 minutos, b) t_r = 18 minutos.	96
Figura 52: Fragmentação do íon precursor de m/z 344,1402 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	97
Figura 53: Fragmentação do íon precursor de m/z 322,1574 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	97
Figura 54: Fragmentação do íon precursor de m/z 317,1298 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Concentrações molares de macro e micronutrientes de solução nutritiva empregada no cultivo inicial, baseada na composição da solução de Clark (1975).	46
Tabela 2:	Concentrações molares de macro e micronutrientes de solução nutritiva empregada no cultivo, baseada na composição da solução de Hoagland e Arnon (1950).	47
Tabela 3:	Metodologia empregada na análise de CLAE-DAD.	54
Tabela 4:	Quantidade e qualidade do DNA extraído das amostras das culturas isoladas de bactérias.	66
Tabela 5:	Resultados de coloração e identificação das culturas isoladas pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtidas nos sentido <i>forward</i> ou <i>reverse</i> com o Blastn.	68
Tabela 6:	Intervalo de tempo de cada linhagem em cada meio.	70
Tabela 7:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 267,0673.	81
Tabela 8:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 164,1073.	83
Tabela 9:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 245,1290.	85
Tabela 10:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 269,2107.	93
Tabela 11:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 217,1330.	94
Tabela 12:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 344,1402.	99
Tabela 13:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 322,1574.	101
Tabela 14:	Resultado da base de dados do íon <i>m/z</i> 317,1298.	103

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt : Acetato de etila

Blastn: *Basic Local Alignment Search Tool*

CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL-EM: Cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD: Detector de arranjo de diodo

DNP: Dicionário de produtos naturais

D.O: Densidade óptica

EM-ESI-QTOF: Espectrômetro de Massas de Alta Resolução por Ionização em *Eletrospray*

ESI-MS: *Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry*

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária

FeCl₂: Cloreto de ferro II

KCl: Cloreto de potássio

[M+H]⁺: Molécula protonada

[M+Na]⁺: Molécula sodiada

[M+K]⁺: Molécula com potássio

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NUTRI: Meio de cultivo Nutriente

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RMN: Ressonância magnética nuclear

SB: *System biology*

UV-Vis: Ultra Violeta – Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Produtos naturais: uma visão geral	17
1.2. Desreplicação	18
1.3. Biologia sistêmica	19
1.4. Rizosfera	20
1.5. Micro-organismos	21
1.5.1. Rizobactérias	22
1.5.2. Actinomicetos	24
1.5.3. Fungos endofíticos	25
1.6. Crescimento microbiano	27
1.7. Identificação filogenética	30
1.7.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
1.8. Teste de Gram	33
1.9. <i>Senna spectabilis</i>	34
2. OBJETIVO	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Especificações de materiais e instrumentos	41
3.2. Equipamentos	41
3.3. Soluções empregadas	43
3.4. Cultivo hidropônico de <i>Senna spectabilis</i>	44
3.5. Isolamento de micro-organismos associados à rizosfera de <i>S. spectabilis</i>	48
3.6. Coloração de Gram das culturas isoladas de bactérias	48
3.7. Métodos moleculares para identificação filogenética das culturas isoladas de bactérias	49

3.7.1. Extração de DNA	49
3.7.2. Ampliação do gene 16S rRNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR) e identificação microbiana	50
3.8. Curva de crescimento bacteriano	52
3.9. Cultivo das bactérias pré-selecionadas	52
3.10. Obtenção do extrato bruto	54
3.10.1. Metodologia empregada na análise de CLAE-EMAR	55
3.10.2. Metodologia empregada na análise de CLAE-EM/EM	55
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	57
4.1. Micro-organismos isolados da rizosfera	57
4.2. Teste de Gram	64
4.3. Identificação filogenética das culturas isoladas de bactérias	66
4.3.1. Extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA pela PCR	66
4.3.2. Identificação filogenética	68
4.4. Curva de crescimento microbiano	69
4.5. Perfil cromatográfico (FingerPrint)	71
4.6. Desreplicação	78
CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108

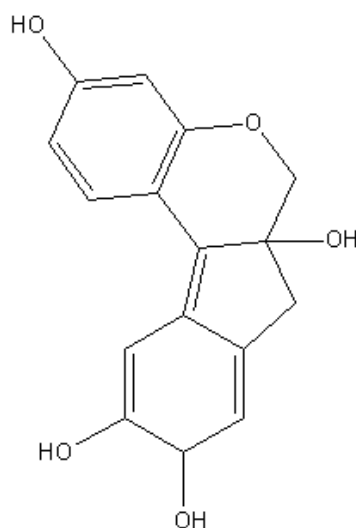
INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Produtos naturais: uma visão geral

Os produtos naturais têm sido fonte de agentes terapêuticos ao longo de milênios na história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. Em termos de Brasil, iniciou-se com a extração da brasilina (Figura 01), um corante vermelho, da árvore do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), muito utilizada no tingimento de roupas e tinta de escrever, sendo o principal produto de exportação da colônia durante dois séculos (PINTO, 1995, p. 608). Mais tarde, quando Portugal passou a perder o domínio do comércio da Índia para os ingleses e holandeses, iniciou-se a corrida às especiarias do sertão (baunilha, canela, cravo, anil, urucum e etc.) (CARNEIRO, 1956, p. 78).

Figura 01: Brasilina, corante extraído do pau-brasil.



Brasilina

Nos tempos modernos, avançadas tecnologias têm sido desenvolvidas para a exploração de fontes exóticas para novos agentes quimioterapêuticos (MOLINSKI, 2010, p. 321). Entretanto, a descoberta de novos fármacos tem caído consideravelmente nos últimos anos devido ao conhecimento dos principais quimiotipos produzidos por plantas e o uso de abordagens reducionistas que estimulam a pesquisa por mecanismos químicos e farmacológicos em nível molecular (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005).

Para superar esse problema, a química de produtos naturais tem buscado alternativas por fontes naturais ainda pouco exploradas (exemplo: rizosfera e suas interações microbianas, organismos marinhos, etc). Na pesquisa por agentes bioativos e em novas metodologias no âmbito da biologia sistêmica ou *system biology* (SB), que considera as patologias e os mecanismos terapêuticos como processos multifatoriais, da metabolômica, que proporciona informações do perfil metabólico tanto do agente terapêutico quanto do doente, que relaciona o perfil metabólico a perturbações externas causadas, por exemplo, por dieta e toxinas, a quimiometria, que permite a análise dos complexos processos multifatoriais e sua interpretação, e a desreplicação, que simplifica o processo analítico através da detecção *in silico* de moléculas previamente conhecidas (ULRICH-MERZENICH et al., 2007; NICHOLSON; LINDON, 2008, p. 1054; LANG et al., 2008; LI et al., 2009).

1.2. Desreplicação

A busca por novas fontes de produtos naturais tem sido responsável, na última década, pelo aumento do uso de ferramentas analíticas de vanguarda que possibilitem uma análise rápida e eficiente destas matrizes complexas nos programas de bioprospecção atuais.

A “desreplicação” (do termo em inglês, *dereplication*) foi denominada pela comunidade científica na década de 50, constitui metodologias rápidas de detecção de substâncias contidas em uma matriz bruta com o objetivo de evitar o re-isolamento de compostos já relatados da literatura.

O processo de desreplicação inclui o acoplamento de técnicas de separação e detecção, bem como bioensaios e análise comparativa dos conjuntos de dados obtidos com bibliotecas virtuais que contém dados quimiotaxonômicos,

farmacológicos e pesos moleculares, tais como NAPRALERT ou DNP (Dicionário de Produtos Naturais) (CORDELL et al., 1997; LANG et al., 2008, NG et al., 2009). CL-EM (cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas), RMN (ressonância magnética nuclear), CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) são exemplos de técnicas hífenadas e apresentam vantagens à abordagem clássica de purificação, isolamento e elucidação, devido à sua versatilidade, rapidez e quantidades menores de amostra na análise, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias, evitando-se o re-isolamento de compostos já conhecidos (WOLFENDER et al., 2009; TANG et al., 2009; NG et al., 2009).

Atualmente, o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) vem incorporando metodologias de desreplicação fazendo uso de técnicas como CLAE-IES-EMAR, RMN, abordagens *in silico* através do uso de bases de dados públicas como o Dicionário de Produtos Naturais (www.dnp.chemnet.com), além da geração de perfis cromatográficos de bioatividade, usando leitores de placas de 96 cavidades, na busca por moléculas de interesse, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas abordagens analíticas na busca por agentes terapêuticos para futuro investimento de protótipos à indústria farmacêutica, cosmética e agroquímica.

1.3. Biologia sistêmica

“*System biology*” ou biologia sistêmica (SB), representa uma abordagem experimental na tentativa de estudar sistemas biológicos de uma forma holística, em vez de uma forma atomística ou reducionista.

Em produtos naturais, esse tipo de abordagem visa analisar o maior número de parâmetros possíveis, utilizando bibliotecas de DNA, dados proteômicos e metabolômicos além de identificar a bioatividade de sistemas celulares ou organismos íntegros (órgãos animais, cultura de tecidos, etc.). Esta avaliação de todo um conjunto de dados dos extratos ou compostos puros sobre um sistema vivo permite uma caracterização total dos efeitos e a comparação com efeitos conhecidos. Desse modo podem ser descobertos novos mecanismos de ação, com possibilidade de encontrar um composto com múltiplos efeitos. No caso de misturas, o sinergismo entre compostos pode ser analisado e demonstrado (ULRICH-

MERZENICH et al., 2007; NICHOLSON; LINDON, 2008, p. 1054; FUKUSHIMA et al., 2009).

1.4. Rizosfera

A rizosfera é um termo que foi introduzido por Hiltner em 1904 e define-se como o compartimento do solo diretamente influenciado pela raiz. Esta área possui forte atividade biológica e química devido aos exudatos liberados pela raiz e pela intensa atividade microbiana. (LINES-KELLY et al., 2005; YATEEM et al., 2007).

Os exudatos são açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos, enzimas, etc. Estimulam as interações físicas e biológicas entre as raízes e os organismos do solo, contribuindo para o crescimento das raízes e pela sobrevivência da planta, além de fornecerem alimento para os micro-organismos, o que torna a atividade microbiana na rizosfera muito maior do que qualquer outra parte do solo. Dentre os organismos encontrados na rizosfera se destacam: bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas, nematóides, vermes enquitreídeos, minhocas, centopeias, lacraias, insetos, ácaros, caracóis, pequenos animais e vírus do solo que competem constantemente por água, nutriente e espaço. Para que esses micro-organismos possam se estabelecer nesse ambiente tão dinâmico e competitivo a destreza de multiplicação, diversidade metabólica e a capacidade de produzir compostos antagônicos podem favorecer esses organismos na colonização radicular (ROMEIRO & GARCIA 2003). No entanto, o destino completo dos exudatos na rizosfera e a complexa natureza de suas reações no solo permanecem pouco compreendidas. (LINES-KELLY, 2005, p. 1; FAURE; VEREECKE; LEVEAW, 2009).

1.5. Micro-organismos

Os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente contribuindo para a estabilidade de ecossistemas, mantendo relações ecológicas com outros organismos. Desta forma há uma diversidade de metabolitos bioativos que eles produzem (primário e secundário), que têm sido amplamente estudados pelo homem na busca por novos fármacos e/ou por enzimas de interesse biotecnológico (Pace 2002, p. 734). São vários os exemplos da utilização desses recursos pelo homem:

- Na medicina: na produção de diversos compostos bioativos, exemplo: antiparasitários, antimicrobianos (penicilina, estreptomicina e etc.) e antitumorais;
- Na indústria: na transformação de substratos em produtos de maior valor agregado, exemplo: etanol, acetona, propanol, plástico biodegradável;
- Na agricultura: destacam-se os micro-organismos que promovem o crescimento de plantas como os fixadores de nitrogênio e solubilizadores de fosfatos, e os empregados no controle biológico de pragas e vetores (exemplo: controle da lagarta da soja da cigarrinha da cana de açúcar, de fitopatógenos como *Rhizoctonia* e outros);
- Na área de alimentos, são empregados na produção de bebidas, panificação, queijos, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros;
- Na área ambiental, as perspectivas de recuperação do meio ambiente através da biorremediação são bastante promissoras (KURTBBOKE; SWINGS; STORMS, 2004).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos, incluindo, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade.

As aplicações biotecnológicas estão relacionadas com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis em processos para a obtenção de novos antibióticos, antitumorais, probióticos, produtos químicos, enzimas, polímeros, biorremediação de poluentes, recuperação de minérios e outros agentes terapêuticos. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas (COLWELL, 1997, p. 302).

Nas últimas décadas, tem se estudado muito sobre um grupo de bactérias denominadas de maneira geral como rizobactérias, actinomicetos e fungos endofíticos (KLOEPPER; ZABLOTOWICZ; LIFSHITZ, 2006). Considerando a sua enorme importância como componentes de ecossistemas e comunidades biológicas, e o papel que desempenham em ciclos biogeoquímicos associados à manutenção da biosfera, pouca atenção tem sido dada à importância dos micro-organismos.

1.5.1. Rizobactérias

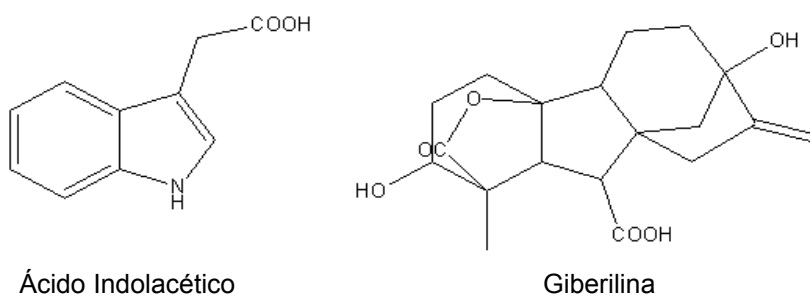
As bactérias da rizosfera que colonizam as raízes das plantas são denominadas como rizobactérias. Vários gêneros bacterianos são conhecidos, entre eles, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia* e *Enterobacter* (BASHAN; BASHAN, 2005, p. 103). Dentre esses se destacam as bactérias do gênero *Pseudomonas* pelo fato de ocorrerem no solo em elevadas populações (MELLO, 1998, p. 88).

As rizobactérias podem atuar, indiretamente, pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação de enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos promovendo o crescimento da planta (MARIANO; KLOEPPER, 2000, p. 121).

Quanto a produção de fitormônios, já se sabe que as rizobactérias como *Pseudomonas* ssp são capazes de sintetizar substâncias como as giberelinas que atuam na divisão e alongamento celular, interrupção da dormência e aumento do desenvolvimento dos frutos, e o ácido indolacético (AIA) que em baixas concentrações pode estimular, enquanto que em altas concentrações, pode inibir o crescimento das raízes. Os níveis de AIA produzidos dependem do crescimento

bacteriano e da atividade metabólica (FREITAS; GERMIDA, 1992, p. 1127; LAMBRECHT et al., 2000).

Figura 02: Estrutura química dos hormônios produzidos por plantas.



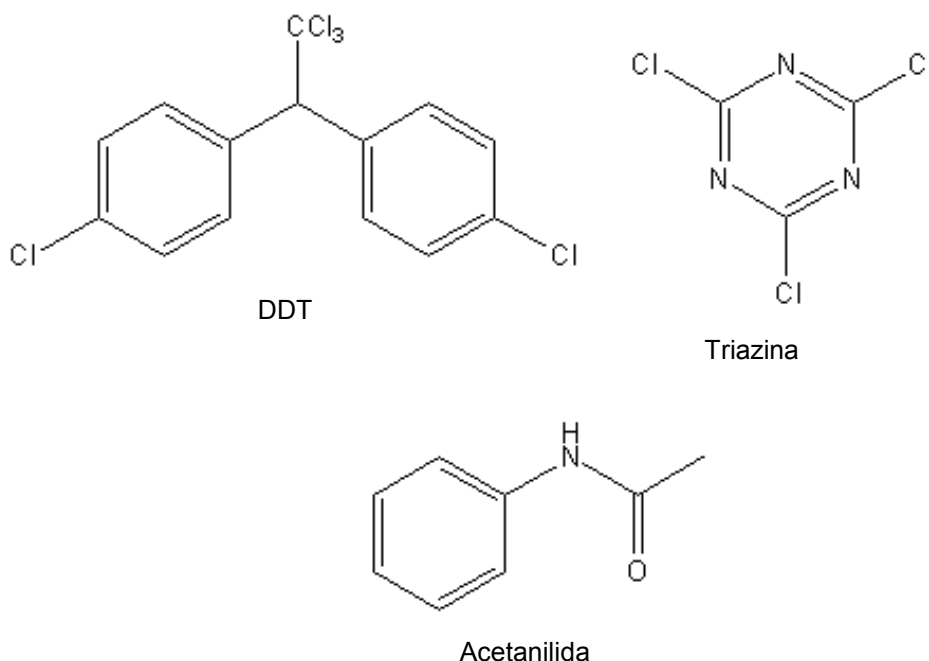
Já, na promoção do crescimento de plantas pode-se mencionar o trabalho de Gasoni et al., 2001, o qual observou o crescimento na cultura de alface, quando as sementes foram tratadas com *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*. O estímulo ao crescimento vegetal pode ser o resultado tanto de ações diretas, como o aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta e a produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como a produção do etileno (promove o amadurecimento dos frutos), ou indiretas, a exemplo do controle de fitopatógenos por competição, produção de sideróforos, antibiose (metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro, inibindo o crescimento ou inativando a célula por toxicidade química) e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001; SHISHIDO; BREUIL; CHANWAY, 1999).

Apesar de haver um elevado número de pesquisas sobre a utilização de rizobactérias na agricultura, há poucos trabalhos sobre o emprego dos metabólitos produzidos por esses micro-organismos. Em decorrência, busca-se, a compreensão das relações moleculares gerando uma abordagem racional no estudo da relação existente entre a rizosfera e as rizobactérias que a habitam.

1.5.2. Actinomicetos

Actinomicetos compreendem um grupo heterogêneo de bactérias Gram positivas, filamentosas, que em seu crescimento formam redes de filamentos ramificados (ENSIGN, 1978, p. 185). São essenciais na decomposição dos compostos orgânicos e pesticidas como: organoclorados, triazinas simétricas, triazinonas, carbamatos e acetanilidas (FIGURA 03) podendo ocorrer à utilização destes compostos como única fonte de carbono e energia para o seu metabolismo. Possuem metabolismo extremamente rico e, frequentemente, acompanhado por produção de metabólitos secundários de extrema diversidade química, são também notórios na produção de pigmentos, enzimas extracelulares e terpenóides (SCHRIJVER; MOT, 1999, p. 85, GROTH et al. 1999). Sendo encontrados em vários habitats, como na água, plantas em decomposição, nódulos de raízes das plantas, sedimentos, porém seu habitat principal é o solo (McCARTHY; WILLIAMS, 1990, p. 189).

Figura 03: Exemplos de compostos orgânicos e pesticidas.



Os actinomicetos produzem inúmeros compostos químicos como: vitamina B12 (cianocobalamina), flavoproteínas, tiaminas e seus derivados, várias porfirinas, as quais contêm compostos com ferro, além de antibióticos como a estreptomicina, sintetizada por *S. griceus*; a clorotetraciclina, sintetizada por *S. aureofaciens*; a terramicina, sintetizada por *S. rimosus* e a avermectina, produzida pelo *Streptomyces avermetilis* (CARRER FILHO, 2002, p. 78).

1.5.3. Fungos endofíticos

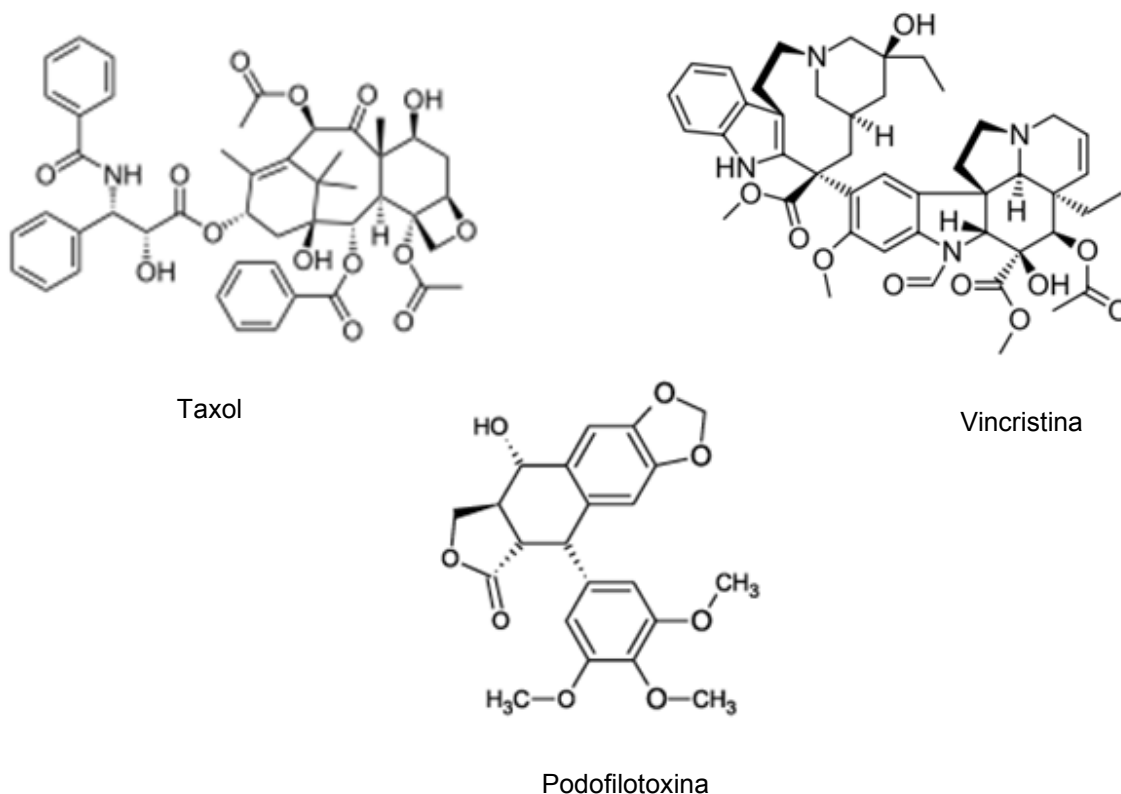
Fungos endofíticos são micro-organismos, que habitam o interior dos tecidos vegetais em pelo menos uma fase de seu desenvolvimento, sem causar mal ao hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2006, p. 189). A espécie hospedeira pode ser infectada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (MELLO, 1988, p. 88, ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011).

A colonização, adaptação e propagação dos fungos endofíticos no hospedeiro, podem ser beneficiadas com a produção de compostos que atuem na competição com outros micro-organismos, animais herbívoros e promoção de crescimento vegetal (AZEVEDO et al., 2002, ZHI-LIN; CHUAN-CHAO; LIAN-QING, 2007).

Estes organismos são de grande importância biotecnológica já que muitos são produtores de metabolitos secundários, novos produtos farmacêuticos e também podem ser utilizados como agentes de controle biológico, sintetizando substâncias que inibem ataques de mamíferos, insetos e nematoides. Alguns exemplos de metabolitos bioativos produzidos por esses organismos são cercosporamida, enfumagina, tricodemina, palmarumicina, ácido nodulisporico, crisogenamida A, antraquinonas entre outros, com diferentes atividades biológicas relatadas, como, antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica. (WANG et al., 2012; ONDEYKA et al., 1997; ZHANG et al., 1999; GUO et al., 2000, ZHANG; SONG; TAN, 2006; SHWETA et al., 2010, KUSARI; SPITELLER,

2011, p. 1203). Alguns estudos mostram que os fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas. Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol (FIGURA 04), um importante fármaco anticancerígeno, produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância. Outro importante anticancerígeno é a vincristina (FIGURA 04) isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta. Podofilotoxina (FIGURA 04), também utilizada no tratamento de câncer, é encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophyllum* e também relatada nos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii*. (ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011, JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN 2011; GREVE et al., 2010).

Figura 04: Estrutura química de alguns metabólitos secundários de importância produzidos por fungos endofíticos.



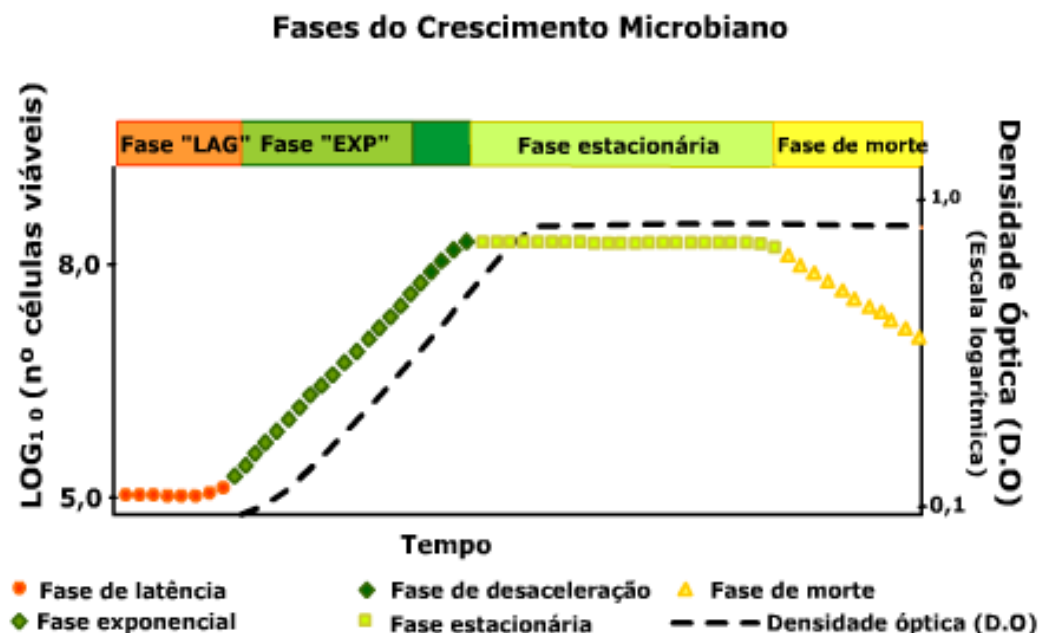
1.6. Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é normalmente associado ao crescimento de uma população de células de um dado micro-organismo, ou seja, com o aumento do número de células da população. Grande parte dos micro-organismos multiplica-se por fissão binária ou por gemulação, em resultado do que uma célula dará origem a duas ao fim de um certo tempo (tempo de geração ou de duplicação).

Durante um ciclo de divisão celular correspondente ao tempo de geração ou duplicação, todos os componentes celulares mensuráveis (ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos) duplicam, acompanhando a duplicação do número de células e da quantidade de biomassa presente, em condições nutricionais e ambientais adequadas, às quais o micro-organismo está adaptado. O crescimento microbiano pode ocorrer em meio líquido com as células em suspensão ou associado a superfícies, sob a forma de biofilmes.

A determinação da evolução ao longo do tempo da concentração de um componente celular, da concentração de células ou da biomassa em suspensão em meio de crescimento líquido, permite obter experimentalmente a curva de crescimento da população microbiana (Figura 05).

Figura 05: Curva de crescimento microbiano teórico.



Fonte: adaptado de Madigan et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003.

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano é importante para se conhecer o ciclo biológico das linhagens, bem como a produção dos seus metabólitos. Os metabólitos primários são produzidos na fase de intenso crescimento bacteriano (Log), já os metabólitos secundários são produzidos na fase estacionária.

- **Fase de latência (ou "LAG")**

Durante o período de tempo que se segue à inoculação do meio de cultura, as células do micro-organismo têm normalmente que se adaptar ao novo meio. Durante este período inicial, pode não ocorrer multiplicação celular, pelo menos em condições de equilíbrio, verifica-se, por exemplo, a síntese de novas enzimas. Estas podem ser necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento e que não se encontrem presentes no meio de cultura. Esta fase dita de latência pode ter uma duração mais ou menos extensa, consoante o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento. Por exemplo, a presença de uma percentagem elevada de células não-viáveis no inóculo, um meio de cultura contendo uma fonte de carbono difícil de metabolizar ou a incubação em condições ambientais de estresse a que o organismo não se encontra adaptado.

- **Fase exponencial (ou "EXP")**

Após um curto período de aceleração, a taxa de crescimento da população microbiana torna-se constante, isto é, as células sofrem divisão e o seu número duplica após um determinado intervalo de tempo. Durante esta fase, em que todos os nutrientes estão presentes em excesso, os micro-organismos dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento máxima que depende do potencial genético do micro-organismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.).

- **Fase de desaceleração**

Durante esta fase ocorre um declínio da taxa específica máxima de crescimento, em resultado da diminuição para valores limitantes do crescimento da concentração de um ou mais nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de produtos do metabolismo tóxicos para as células.

- **Fase estacionária**

Na fase estacionária o esgotamento de um nutriente essencial e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva que a divisão da população pare. No entanto, em carência de nutrientes, as células podem manter-se viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos, à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção. Contudo, mais cedo ou mais tarde, verifica-se um declínio da concentração de células viáveis durante a fase de morte celular.

- **Fase de morte**

Durante a fase de morte ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular (morte celular). Tal origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana ao longo do tempo.

1.7. Identificação filogenética

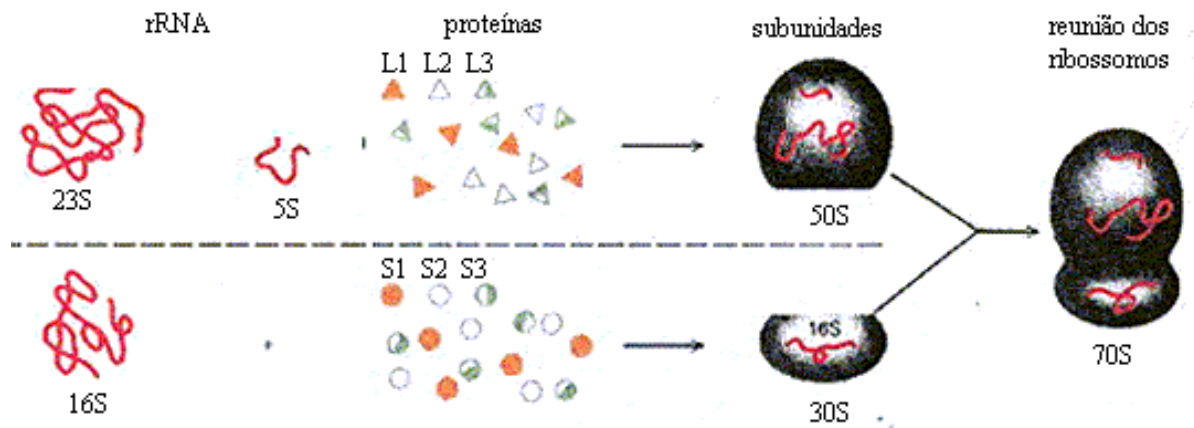
Técnicas de biologia molecular tem se mostrado uma ferramenta importante para a análise da estrutura e composição das espécies da comunidade microbiana. O qual, se destaca à análise de sequências de RNAr, explorado para inferir relacionamentos filogenéticos entre micro-organismos. Uma das vantagens de usar informações sobre sequências do RNAr é sua disponibilização em base de dados, na maioria dos casos, acessíveis, gratuitamente, permitindo a comparação de novas sequências obtidas com as presentes nessas bases. Além disso, o isolamento de genes RNAr para análise filogenética proporciona uma visão mais representativa da estrutura da comunidade microbiana do que as técnicas clássicas (REYSENBACH et al., 1992). O RNAr e seus genes correspondentes (DNAr) são muito utilizados como marcadores biológicos para a evolução, várias as razões (OLSEN et al., 1986):

- O RNAr está presente no mecanismo de síntese proteica e apresenta a mesma função em todos os organismos;
- Toda estrutura do RNAr é conservada (taxa de mutação baixa), assim fornecendo informação filogenética segura;
- As moléculas 16S RNAr ($\pm$ 1500 nucleotídeos) e 23S RNAr ($\pm$ 3000 nucleotídeos) contêm suficiente informação, para comparações significativas e satisfatórias.
- Os RNAr e seus genes são facilmente acessíveis, devido as técnicas de PCR e sequenciamento.

Os ribossomos, em bactérias, são compostos de duas subunidades, uma subunidade grande 50S e uma subunidade pequena 30S. A subunidade 50S contém o rRNA 23S, um RNA 5S e mais de 30 proteínas. A subunidade 30S contém o rRNA 16S e mais 20 proteínas, ilustração apresentada na Figura 06 (PEI et al., 2009). A

pequena subunidade ribossomal 16S rRNA, é atualmente a molécula de escolha para a identificação de bactérias e outros micro-organismos.

Figura 06: Representação das subunidades do ribossomo de procariotos.

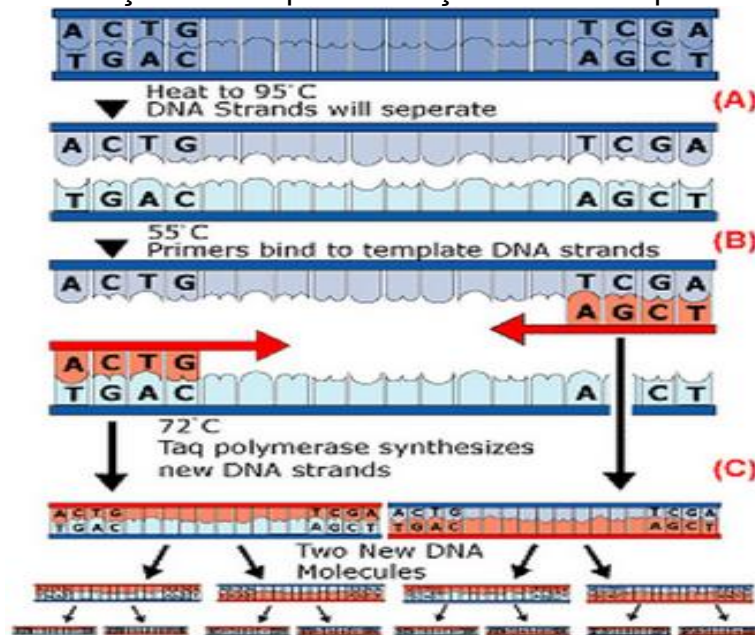


Fonte: www.icb.ufmg.br – acessado em 10/01/2014.

1.7.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O método de amplificação de ácidos nucleicos conhecido como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi descrito em 1983 por Kary Mullis (SAIKI et al., 1985) e tornou-se uma das mais importantes inovações científicas das últimas décadas. A técnica permitiu a amplificação do DNA *in vitro*, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela polimerase, cuja atividade depende de íons Mg^{2+} . Os produtos obtidos após amplificação podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose, quanto ao tamanho do fragmento amplificado (ROSADO; DUARTE, 2002, p. 97; REIS JÚNIOR et al., 2002). Atualmente, a PCR tornou-se uma das técnicas mais simples e rápidas para a amplificação do DNA. A Figura 07 ilustra a reação em cadeia polimerase, que ocorre principalmente em três etapas.

Figura 07: Ilustração das etapas da reação em cadeia polimerase (PCR).



Fonte: www.biomedicinapadrazo.com – acessado em 15/11/2013.

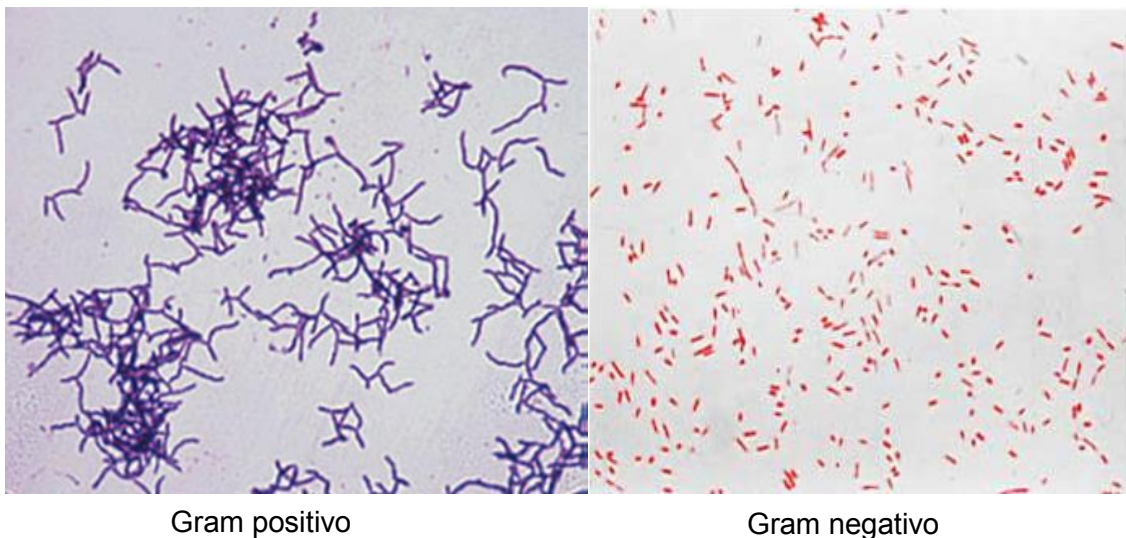
- (A) Desnaturação: ocorre a separação da dupla fita do DNA a ser amplificado pelo aumento da temperatura;
- (B) Anelamento: ocorre o pareamento do iniciador, “primer” ao DNA a ser amplificado;
- (C) Extensão: ocorre a polimerização propriamente dita (ação da DNA polimerase).

Os produtos obtidos após amplificação podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose, quanto ao tamanho do fragmento amplificado. O desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de sequências em bases de dados públicas de livre acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), permite o sequenciamento comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

1.8. Teste de Gram

A coloração de Gram é um método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, em 1884 (BOTTONNE, 1988, p. 288), Hans observou que as bactérias adquiriam cores diferentes quando tratadas com diferentes corantes, permitindo classifica-las em dois grupos distintos: Gram positivas (coloração roxa) e Gram negativas (coloração vermelha), como mostra a Figura 08.

Figura 08: Ilustração do teste de Gram.



Fonte: www.micro-esalq.blogspot.com – acessado em 15/11/2013.

O método consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol ou acetona e fucsina básica, é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol ou acetona, enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (BOTTONNE, 1988, p. 288).

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia e de análises clínicas, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas das bactérias associadas a infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-

negativas em esfregaços de pus ou de fluidos orgânicos. Essa informação permite ao clínico monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. É possível a análise de vários esfregaços por lâmina, o que facilita a comparação de espécimes clínicos. As lâminas podem ser montadas de forma permanente e preservadas como documentação (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

1.9. *Senna spectabilis*

O gênero *Senna*, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), teve sua taxonomia recentemente revisada, sendo verificada a sinonímia com diversas espécies de *Cassia*. Constitui um dos maiores gêneros de Fabaceae, com aproximadamente 600 espécies distribuídas por todo o mundo, sendo detentoras de emprego na medicina popular (PIVATTO, 2005, p. 156). *Senna spectabilis* é uma planta arbórea, pertencente à sub-família Caesalpinioideae, conhecida popularmente como são-joão, cássia-do-nordeste, canafístula-de-besouro e pau-de-ovelha, possuindo como sinônimas botânicas *Cassia spectabilis* (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

As plantas desta espécie têm porte médio com 8 a 10 m de altura e caule com 30 a 40 cm de diâmetro; as folhas são compostas por 8 a 12 pares de folíolos pontiagudos na extremidade. Florescem em buquês de flores amarelas na ponta dos ramos, sendo os frutos em favas (Figura 09), bastante empregada no paisagismo, podendo ser destinadas à recomposição de áreas degradadas.

Figura 09: Imagem da flor, folha e árvore da *Senna spectabilis*.



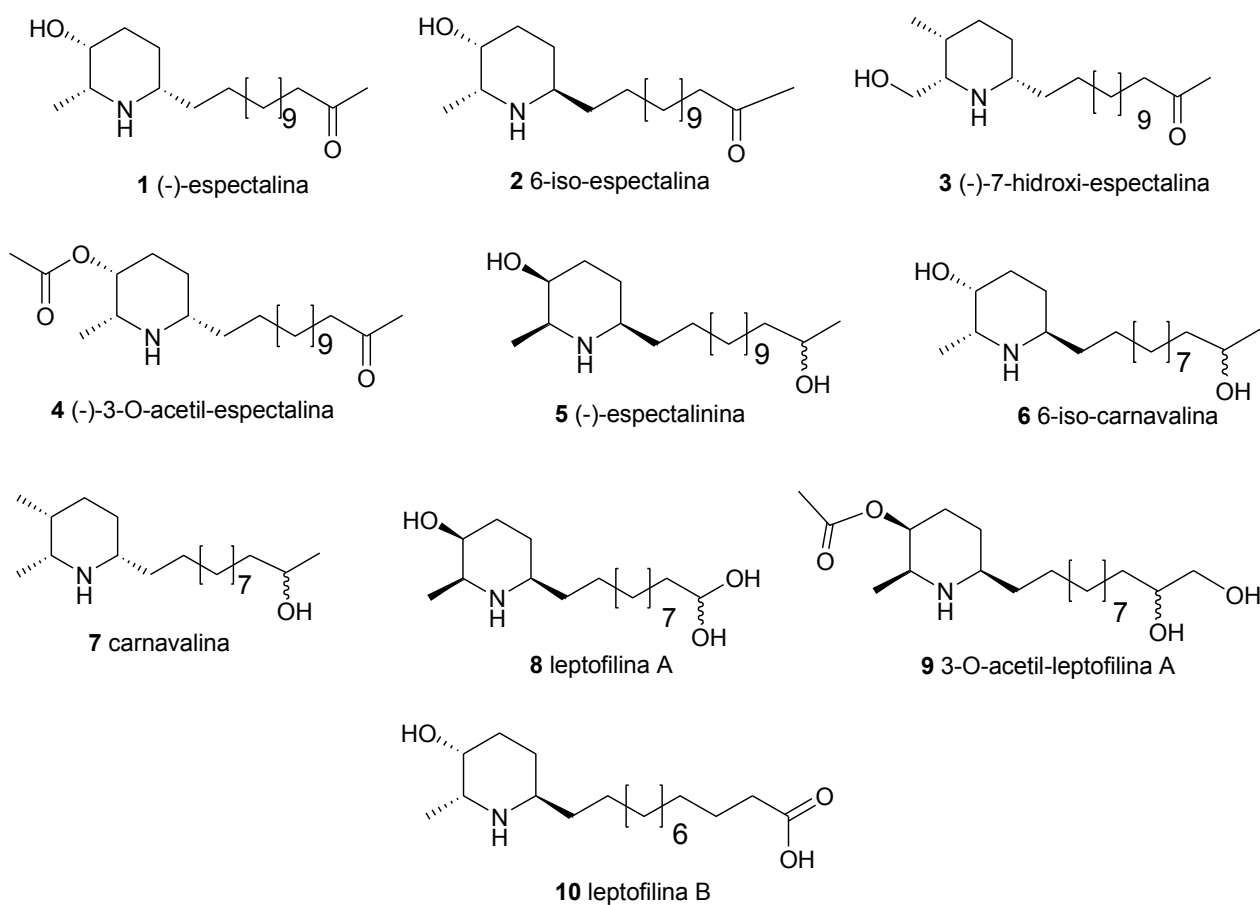
Fonte: www.commonswikimedia.org – acessado em 12/06/2013.

No Brasil é encontrada nos estados do Paraná e Santa Catarina, na floresta dos pinhais, na forma nativa, mas desenvolve-se bem sob cultivo na região sudeste. Revisões bibliográficas demonstraram que foram isoladas mais de 350 metabólitos secundários de diversas classes de substâncias de mais de 30 espécies, e além do estudo químico, propriedades etnofarmacológicas e algumas farmacológicas já foram validadas para vários extratos (SILVA, 2005, p. 306). Apresentam flavonoides, antraquinonas, estilbenoides, dentre outros, como constituintes químicos de maior ocorrência, associados às atividades antibacteriana, citotóxica, antifúngica, antioxidante e hepatoprotetora relatadas (SILVA et al., 2010).

O estudo fitoquímico de *S. spectabilis* mostrou a presença dos alcalóides piperinídicos: (-)-espectalina (1), leptofilina A (8), 3-O-acetil-leptofilina A (9), leptofilina B (10), (-)-espectalinina (5), carnavalina (7) e 6-iso-carnavalina (6) nas folhas desta espécie, sendo que as substâncias apresentaram atividade citotóxica seletiva em cepas de *S. cerevisiae* com deficiência no reparo do DNA, sendo

indicativo de atividade antitumoral potencial (PIVATTO, 2005, p. 153). Estudos recentes realizados por Viegas Junior et al. (2004) estudando as flores de *S. spectabilis*, resultaram no isolamento de três novos alcalóides, chamados de (-)-3-O-acetil-espectalina (4), (-)-7-hidroxi-espectalina (3) e 6-iso-espectalina (2), além da (-)-espectalina (1) já conhecida (Figura 10).

Figura 10: Metabólitos secundários obtidos de *Senna spectabilis*.



Fonte: PIVATTO et al., 2005.

Estudos recentes propõem que alcalóides piperidinícos são os responsáveis pelas propriedades farmacológicas das plantas deste gênero, como atividades antiinflamatórias, analgésica periférica, laxativa, anestésica, antimicrobial (VIEGAS JUNIOR et al., 2004; VIEGAS JUNIOR et al. 2006) e, principalmente, como inibidores da acetilcolinesterase, sugerindo um potencial tratamento para a doença de Alzheimer, pois a acetilcolinesterase impede a passagem do estímulo entre os neurônios prejudicando o funcionamento correto

do cérebro, em especial a memória (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995; MOREIRA et al. 2003).

Pivatto et al. (2005) confirmaram a presença de alcalóides piperidínicos nos extratos etanólicos de *S. spectabilis*, apresentando também propriedades anticolinestéricas e indicou a necessidade de investigação da biossíntese.

Diante do potencial etnofarmacológico e dos resultados preliminares de bioatividade observados, esta pesquisa visa o estudo da rizosfera da espécie *Senna spectabilis*, na busca por moléculas bioativas produzidas tanto na região rizosférica como por micro-organismos diretamente associados à rizosfera através de propostas analíticas inovadoras que conjuguem estudos metabolômicos associados às principais ferramentas espectroscópicas do estado da arte, visando o entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- Isolar e identificar rizobactérias presentes na rizosfera de *Senna spectabilis*;
- Selecionar organismos que estejam associados ao desenvolvimento da espécie vegetal e cultivo em microescala dos mesmos para obtenção dos extratos brutos;
- Obter o perfil cromatográfico (*fingerprint*), a partir dos extratos produzidos pelos micro-organismos pré-selecionados;
- Aplicar métodos de desreplicação e análise *in silico* dos extratos brutos, empregando a técnica hifenada CLAE-IES-EM/EM.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Especificações de materiais e instrumentos

Para o crescimento e reprodução dos micro-organismos o material utilizado (placa de petri, espátulas, erlenmeyers, micropipetas, alças), foi esterilizado fazendo o uso de autoclave (15 minutos, a 121°C).

Na análise do produto amplificado, por PCR, foi utilizado, como referência, o marcador de tamanho molecular 1 kb Ladder da Fermentas.

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização dos experimentos foram:

- BALANÇA ANALÍTICA - Os meios de cultura e as amostras dos extratos foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo AG 245.
- AUTOCLAVE VERTICAL - A esterilização dos meios de cultura e, dos frascos coletores de amostras, e o descarte do material microbiológico foram realizados em autoclave Quimis Aparelhos Científicos Ltda.
- CÂMARA DE FLUXO LAMINAR - O repique, o isolamento e a inoculação dos micro-organismos foram realizados em câmara de Fluxo Laminar Pachame PA 310-Serie 172-99.
- NANODROP - ND2000 *Spectrophotometer* - Intas, Göttingen, Germany.
- TERMOCICLADOR – PTC-100 “programa termal controller”-MJ Research, Inc[®].
- CUBA HORIZONTAL- Horizon[®] 58 Life Technologies[®].

- FOTODOCUMENTADOR- gel doc 2000- bio rad; software – Quantity-ONE.
- SEQUENCIADOR DNA- ABI Prism 3700 DNA Analyzer - Applied Biosystems.
- SOFTWARES: SeqMan do software DNASTAR-Package Software - Lasergene sequence analysis.
- SHAKER -- WEQ CFW08.
- ESPECTROFOTÔMETRO UV/VIS – Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro.
- ESPECTRÔMETRO DE MASSAS – ESI-MS micro-TOF – Bruker-Daltonics, Billerica, USA.
- ESPECTRÔMETRO 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC-MS-MS Mass Spectrometer), operando em modo positivo e ionização por IES.
- CROMATOGRÁFO LIQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC – Shimadzu acoplado as bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10VP-Shimadzu, detector de arranjo de diodos UV/VIS-Shimadzu PC 1520 – Diode Array.
- Coluna cromatográfica - Phenomenex C18 Onyx monolítica, ODS, 100 x 4,60 mm, (mesoporos 13 nm e macroporos 2 µm.)
- MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CAMPO CLARO – Motic AE31 – Quimis.
- EVAPORADOR ROTATÓRIO A VÁCUO – Buchi R- 114.

3.3. Soluções empregadas

A água utilizada no preparo dos meios de cultura e das soluções empregadas foi deionizada (18mΩ; Milli-Q, Millipore). Os meios foram autoclavados durante 15 minutos, a 121°C. Para o processo de extração de DNA, PCR, identificação filogenética, crescimento das linhagens e extração dos metabolitos as soluções empregadas foram:

- GEL DE AGAROSE – 1,5% de agarose dissolvidos em tampão TBE 1X.
- *LOADING BUFFER*- 0,5% de azul de bromofenol dissolvido em glicerol 50%.
- TAMPÃO TBE 1X – Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e ácido bórico mM com pH 8,3. O tampão é armazenado em geladeira até o momento do uso, quando, então foi adicionado 0,5µg/mL de brometo de etídio.
- TAMPÃO TE -10:1 -10 mM Tris HCL (pH 7,4), 1 mM EDTA.
- TAMPÃO PARA REAÇÃO PCR -200 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,4.
- ENZIMA- Taq DNA polimerase – INVITROGEN.
- Meio de cultura líquido: Czapeck – Dox Broth (DIFCO), 35 g. L⁻¹, composição: Sacarose - 30g; NaNO₃ - 3g; Na₂(PO₄)₃ - 1g; MgSO₄ - 0,5g; KCl - 0,5g; FeSO₄ - 0,01g; Agar - 15g).
- Meio de cultura líquido: Nutriente (Nutri)-Dox Broth (DIFCO), 8 x g. L⁻¹, composição: Digestão péptica de tecido animal – 5g; extrato de bife – 1,5g; extrato de levedura – 1,5g; NaCl – 5g.

Para o teste de Gram, os corantes utilizados foram preparados da seguinte forma:

- CRISTAL VIOLETA - violeta cristal 1,0g; Fenol 2,0g; Álcool 95% 10 mL e água destilada 100 mL – fez-se uma solução com o violeta cristal e a solução alcoólica. Fez-se outra solução com o fenol e água destilada. Misturaram-se as duas soluções.
- SAFRANINA – safranina 0,5g; álcool 95% 10 mL; água destilada 100 mL – Misturou-se a safranina a 2,5% em solução alcoólica; retirou-se 10 mL dessa solução, adicionando-se q.s.p 100 mL com água destilada.
- LUGOL – Iodo 1,0g; Iodeto de potássio 2,0g; água destilada 300 mL – trituraram-se juntos o iodo e iodeto com água em almofariz.

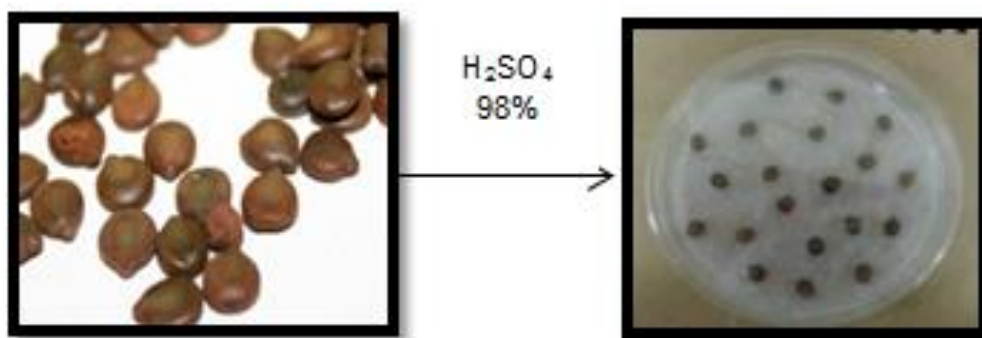
3.4. Cultivo Hidropônico de *Senna spectabilis*

Sementes de *S. spectabilis* foram coletadas a partir de vagens de árvores adultas localizadas nas dependências do Instituto de Química na cidade Araraquara – SP, em 2009, por Marcos Pivatto. Esta espécie vegetal possui exsiccatas depositadas no herbário do Instituto de Botânica da cidade de São Paulo sob o nº SP 370 917.

Foi realizada uma pré-seleção buscando uniformidade quanto aos aspectos relativos à cor, tamanho e estado de conservação, eliminando-se as sementes partidas, enegrecidas e/ou injuriadas. A seguir, iniciou-se o processo de escarificação, sendo que, o tratamento utilizado para a quebra da dormência das sementes (JELLER; PEREZ, 2001, p. 93; SOUZA; LUNA, 2008, p. 1) constituiu-se em:

- Escarificação química (100 sementes) - através de imersão em ácido sulfúrico 98% durante vinte e cinco minutos, seguido de sucessivas lavagens com porções de água destilada e imersão por quinze minutos. A Figura 11 apresenta um fluxograma exemplificando o processo de escarificação.

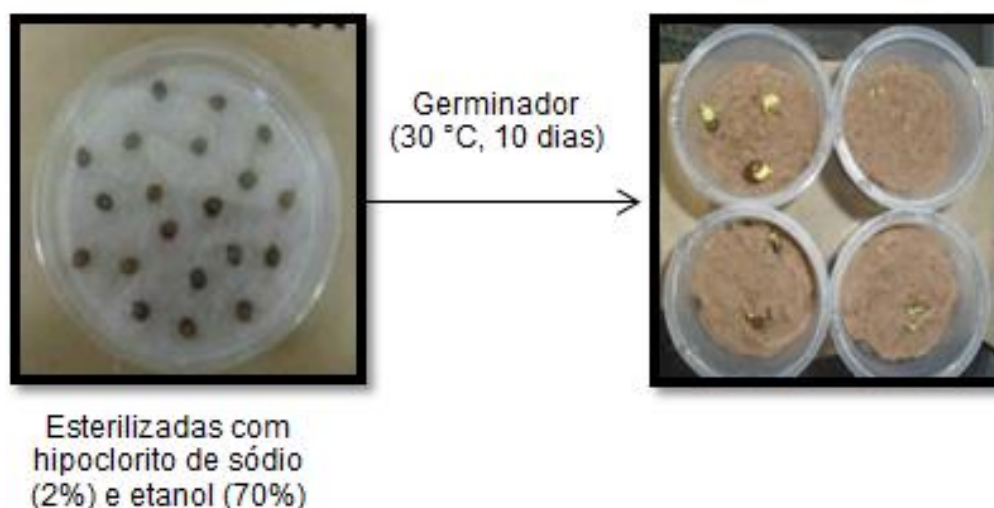
Figura 11: Fluxograma ilustrando o processo de escarificação química.



Após o processo de escarificação e desinfecção, foi dado o início ao processo germinativo, no qual as sementes foram distribuídas igualmente em placas de petri, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 2% e etanol 70%, contendo papel de filtro embebido em 4 mL de água destilada. As placas foram vedadas com PVC e mantidas em germinador a 30°C.

As sementes foram consideradas germinadas após a emergência da radícula através do tegumento (aprox. 3 mm). Quando todas as sementes haviam germinado ou suas remanescentes nas placas apresentavam sinais de deterioração, os experimentos foram considerados finalizados e, então, promoveu-se a transferência das sementes germinadas para recipientes contendo areia (previamente autoclavada), tais vasos receberam três sementes cada e foram mantidos no germinador por três dias, na sequência, foram introduzidos em casa de vegetação.

Figura 12: Fluxograma ilustrando o processo germinativo.



Após dezessete dias na casa de vegetação, vinte plantas restantes passaram a serem irrigadas com solução nutritiva de Clark (1975) - descrita na Tabela 01 - e permaneceram nos recipientes com areia por mais vinte e cinco dias, após esse período, foram transferidas para vasos plásticos contendo apenas solução nutritiva (sem suporte físico – areia) (Figura 13), entretanto, após trinta dias de cultivo, foi necessário ajustar a concentração dos nutrientes, uma vez que, as plântulas começaram a apresentar folhas amareladas e um tanto murchas. Procedeu-se a aplicar uma solução baseada na composição de (Tabela 02). As plantas se adaptaram muito bem a essa nova solução, com bom desenvolvimento da raiz no sistema aquoso. As soluções foram trocadas por completo a cada quinze dias.

Figura 13: Fluxograma ilustrando a transferência das plântulas de *Senna spectabilis* em vasos contendo areia para o sistema hidropônico.



Tabela 01: Concentrações molares de macro e micronutrientes de solução nutritiva empregada no cultivo inicial, baseada na composição da solução de Clark (1975).

Macronutrientes (mmol.L ⁻¹)						
NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻
0,90	7,30	0,08	1,82	2,60	0,60	0,60
Micronutrientes (μmol.L ⁻¹)						
B	Cl ⁻	Cu ²⁺	Fe [*]	Mn ²⁺	Mo	Zn ²⁺
19,0	0,6	0,5	40,0	7,0	0,6	-

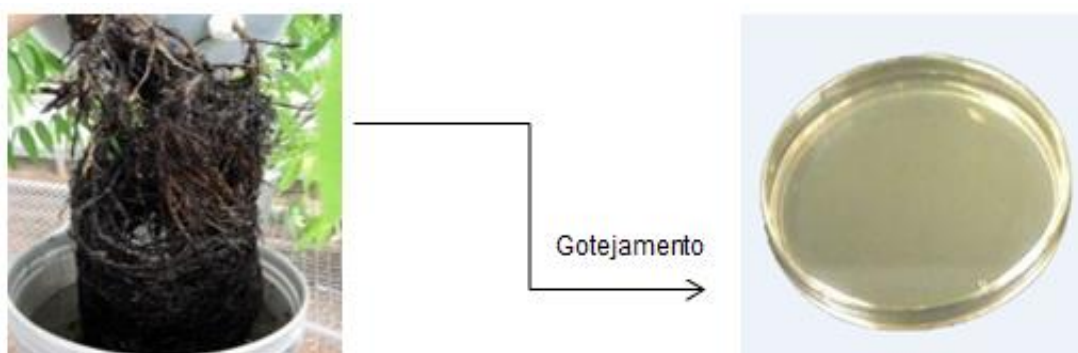
*FeCl₂ quelado com EDTA dissódico.

Tabela 02: Concentrações molares de macro e micronutrientes de solução nutritiva empregada no cultivo, baseada na composição da solução de Hoagland e Arnon (1950).

Macronutrientes (mmol.L ⁻¹)						
N	H ₂ PO ₄ ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻	
15,0	1,00	2,35	5,01	2,00	2,00	
Micronutrientes (μmol.L ⁻¹)						
B	Cl ⁻	Cu ²⁺	Fe ⁺	Mn ²⁺	Mo	Zn ²⁺
19,0	0,6	0,5	40,0	7,0	0,6	-

Após quinze dias no cultivo hidropônico com a solução nutritiva, foi feita a coleta de alíquotas de 1mL dessa solução para isolamento dos micro-organismos associados à região rizosférica. As alíquotas foram gotejadas diretamente da raiz das plântulas e coletadas em frascos estéreis. Após a coleta, as amostras foram repicadas em placas nos meios de cultura de nutriente agar e Czapek-dox agar (Figura 14). Foi realizado um branco, ou seja, placas de petri contendo os meios sólidos foram deixadas abertas expostas ao ar durante todo o procedimento de coleta das amostras (40 minutos).

Figura 14: Ilustração do isolamento dos micro-organismos rizosférico.



3.5. Isolamento de micro-organismos associados à rizosfera de *S. spectabilis*

Os micro-organismos foram isolados do sistema hidropônico (procedimento item 3.4.), utilizando os meios de cultura sólido de Nutriente ágar e Czapek-dox ágar. O volume utilizado para o inóculo foi de 1 mL. Esse volume foi distribuído pela placa através de um alça de Drigask. As placas foram incubadas a 28° C, por 15 dias e observadas diariamente.

Após esse período, foi realizado o repique dos micro-organismos para isolamento dos mesmos. Esse procedimento foi realizado até obtenção da linhagem pura. A preservação das bactérias foi realizada adicionando-se 2 mL do meio de cultura, no qual o organismo foi isolado (Czapek e Nutriente), em tubos de ensaio (13 cm comprimento x 1 cm de diâmetro) e mantido vedados e ao abrigo da luz, em geladeira. Dos micro-organismos isolados, foram escolhidas três culturas de bactérias e realizados os procedimentos posteriores.

3.6. Coloração de Gram das culturas isoladas de bactérias

As culturas de bactérias obtidas dos isolamentos do cultivo hidropônico foram submetidas à coloração de Gram realizada segundo a metodologia descrita em Tortora et al. (2005) que consiste em expor as células bacterianas à seguinte sequência:

Corante primário – cristal violeta: cora o citoplasma de púrpura, independentemente do tipo de célula.

Mordente – solução de iodo (lugol): aumenta a afinidade entre o violeta de cristal e a célula e forma com o corante um complexo insolúvel dentro da célula.

Agente descolorante – álcool (95%), acetona ou ambos, solvente lipídico.

Contrastante – safranina ou fucsina básica: cora o citoplasma de vermelho.

3.7. Métodos moleculares para identificação filogenética das culturas isoladas de bactérias

3.7.1. Extração de DNA

Para analisar o material genético das linhagens pré-selecionadas, utilizou-se a fervura de biomassa celular.

Uma colônia isolada de cada linhagem em separado foi ressuspensa em tubos tipo Falcon (15 mL) com 2 mL de meio de cultivo nutriente usado no isolamento. As culturas foram incubadas a 28 °C por três dias. Uma alíquota de 1 mL da suspensão celular foi transferida para tubo tipo Eppendorf e centrifugada a 13.000 rpm por dois minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 700 µL de água Milli-Q autoclavada. A suspensão foi agitada vigorosamente em agitador de tubos do tipo vórtex por dez segundos e centrifugada nas condições descritas acima. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado seco a temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensa em 400 µL de água Milli-Q autoclavada e incubado em água fervente (100 °C) por quinze minutos para rompimento da parede celular e liberação do DNA. Resfriou-se em temperatura ambiente por dez minutos, seguido de centrifugação (13.000 rpm/15 min/ temperatura ambiente). Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foram colhidos, transferidos para tubo de 0,5 mL, e armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso que ocorreu até uma semana após a extração.

A quantidade de DNA foi determinada fazendo o uso de um NanoDrop ND2000 *Spectrophotometer* (Intas, Göttingen, Germany) utilizando-se 1 µL de amostra.

3.7.2. Ampliação do gene 16S rRNA pela reação da cadeia da polimerase (PCR) e identificação microbiana

Fragmentos dos genes 16S rRNA foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) Ft1(F) 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'e Rd1(R) 5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3' (WEISBURG et al., 1991).

Após a síntese, esses oligonucleotídeos foram diluídos a uma concentração de 1000 pmol/μL em tampão TE 10:1 [10 mM Tris HCL (pH 7,4), 1 mM EDTA], e essa solução foi armazenada em freezer a -20°C. Uma alíquota de 1 μL foi diluída em 99 μL de água Milli-Q estéril, para uma concentração final de 10 pmol/μL, a qual foi utilizada nas reações de amplificação.

Essas reações foram compostas de tampão para reação de PCR (200 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,4), 1 mM de cloreto de magnésio, 250 μM de uma solução de dNTPs, 10 pmol/μL de cada iniciador para o primers Ft1(F) e Rd1(R), 1 μL da enzima Taq DNA polimerase (INVITROGEN), - DNA molde e água estéril filtrada e autoclavada Milli-Q (q.s.p. 20 μL) (SAIKI et al., 1985).

Alíquotas de 3 uL e 5uL de DNA foram utilizadas para verificar a melhor quantidade de DNA nas reações de PCR. Os reagentes foram homogeneizados com auxílio de uma micropipetadora.

Essas reações foram colocadas em aparelho termociclador (PTC-100 “programa termal controller”- MJ Research, Inc[®], EUA) programado com um passo inicial de desnaturação de 95 °C, por três minutos e trinta e cinco ciclos, constituído de três passos: desnaturação a 94 °C por um minuto, pareamento a 55 °C por um minuto, extensão a 72 °C por dois segundos, e um passo extra de extensão a 72 °C por cinco minutos. As reações foram mantidas a 4 °C para conservação do material quando utilizado no mesmo dia ou a -20 °C para uso posterior (WEISBURG et al., 1991).

Após o processo de amplificação, uma alíquota de 3 μL de tampão de amostra (“loading buffer) foi adicionada a 5 μL de amostra. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), acompanhados de uma amostra de DNA contendo fragmentos de tamanho conhecido, múltiplos de 1 kb (1 kb Ladder, Fermentas), com o objetivo de servir

como referência de migração eletroforética para cálculo do tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação, além do controle negativo, substituindo o DNA molde por água Milli-Q estéril, que demonstrou a ausência de contaminantes. As eletroforeses foram realizadas em cubas horizontais, a uma diferença de potencial de migração de, aproximadamente, 50 V por noventa minutos, conduzida em tampão TBE 1X e coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os fragmentos de DNA, dispostos no gel de agarose, foram visualizados pela incidência de luz UV, documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO-RAD) e avaliados usando a imagem negativa, obtida por meio do “software” Quantity-One.

Para as reações de sequenciamento, os produtos da PCR foram amplificados com os iniciadores Ft1(F) e Rd1(R) conforme os procedimentos descritos por Toledo et al. (2009). O sequenciamento dos nucleotídeos foi feito no ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) - UNESP, Campus de Jaboticabal.

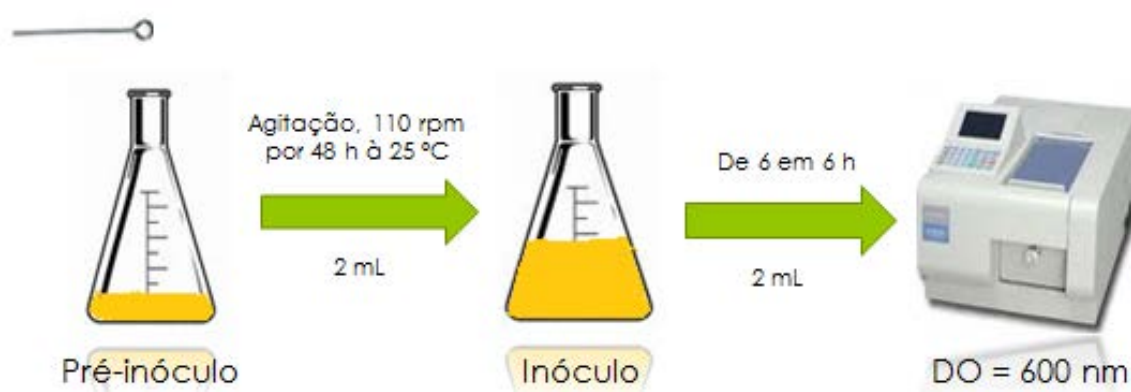
O consenso das sequências “forward” e “reverse” obtidas foi realizado no programa *SeqMan* do *software* DNASTAR-*Package Software* (Lasergene sequence analysis).

Após o alinhamento e averiguação da presença de quimeras, as sequências de nucleotídeos foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa Blastn (“Basic Local Alignment Search Tool”) e comparadas às sequências homólogas depositadas no banco eletrônico de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a aproximação da identidade filogenética.

3.8. Curvas de crescimento bacteriano

Em frascos Erlenmeyers com 100 mL de meio de cultivo líquido, foram inoculadas as linhagens selecionadas e deixadas sob agitação (110 rpm) por quarenta e oito horas a 25°C (pré-inóculo). Após as quarenta e oito horas de crescimento, 2 mL de solução (meio + linhagem crescida) foram transferidos para frascos Erlenmeyers com 300 mL de meio de cultivo líquido mantido sob agitação a 110 rpm e a 25 °C de onde, foram retiradas alíquotas de seis em seis horas para a determinação da densidade óptica, em comprimento de onda em 600 nm (Figura 15)

Figura 15: Ilustração da metodologia realizada para a curva de crescimento bacteriano.

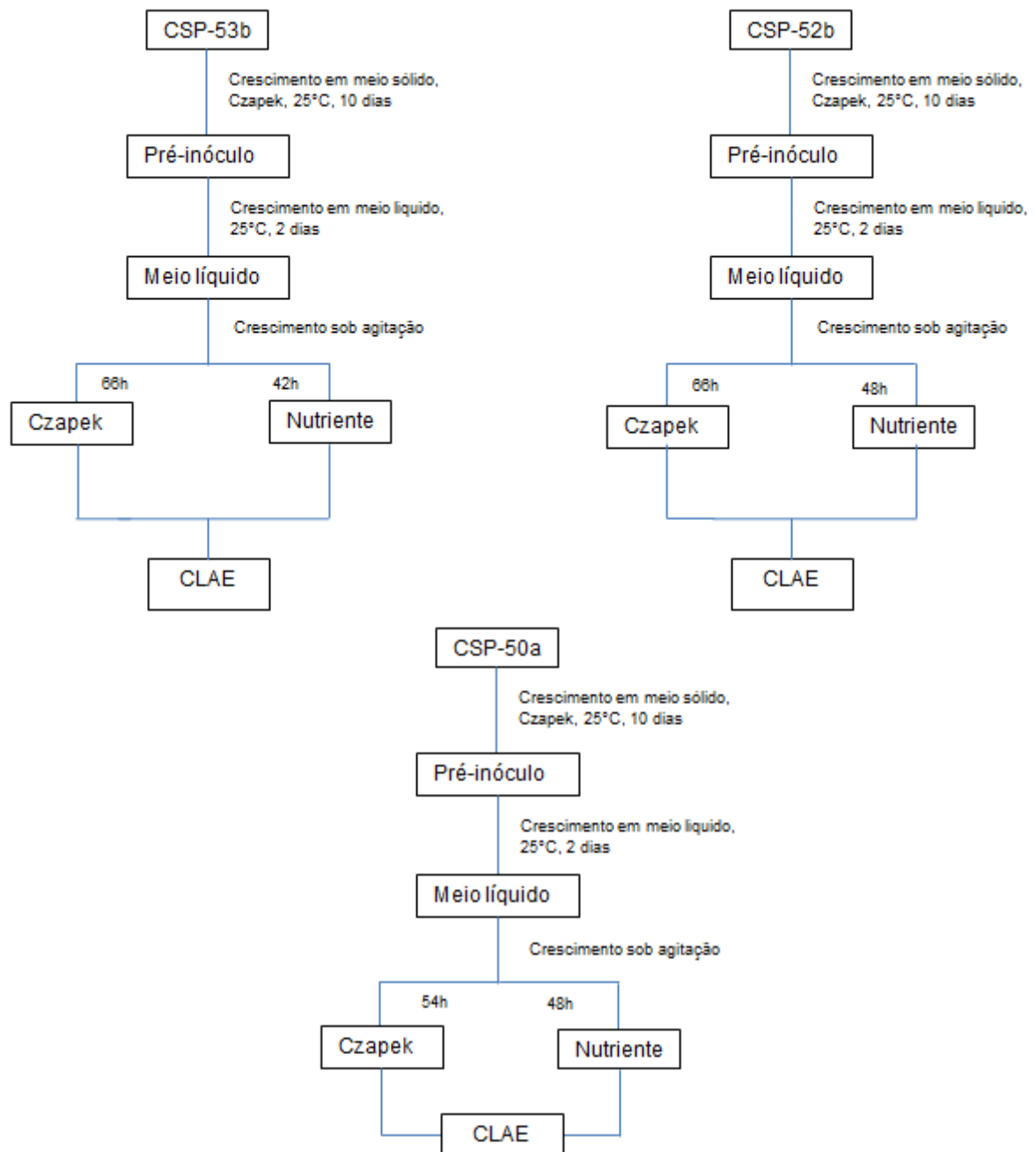


3.9. Cultivo das bactérias pré-selecionadas

Os isolados bacterianos *CSP-50a*, *CSP-52b* e *CSP-53b* foram repicados em placas de Petri contendo meio Czapeck e incubados por dez dias a 25 °C. O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos Erlenmeyers (500mL) contendo 300 mL de meio (Czapeck e Nutri), num total de seis replicatas para cada meio, sendo um separado para o branco. Estes meios foram autoclavados à temperatura de 121 °C, por vinte minutos. Os isolados foram inoculados e incubados a 25 °C por tempos de acordo com a suas respectivas curvas de crescimento para cada meio sob agitação (Figura 16).

Utilizando as mesmas condições de cultivo descritas acima, também foi obtido o extrato bruto dos meios (brancos) sem a inoculação das bactérias, com o objetivo de realizar uma comparação com os possíveis interferentes extraídos do meio de cultivo

Figura 16: Fluxograma do procedimento de crescimento das bactérias CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b.



3.10. Obtenção do extrato bruto

Após o período de incubação, procedeu-se à extração líquido-líquido dos metabólitos secundários produzidos pelas linhagens (CSP-50a, CSP- 52b e CSP-53b) utilizando-se três porções de 300 mL de acetato de etila (AcOEt). Posteriormente o solvente extrator (AcOEt) foi destilado em evaporador rotatório a vácuo, fornecendo os extratos brutos.

Os extratos foram reconstituídos em metanol grau HPLC e realizada uma etapa de clean-up (Strata X, C18) e filtrados em membrana 0,22 µm para posterior análise do perfil cromatográfico (CLAE-DAD) e análise dos metabólitos (CLAE-EMAR e CLAE-EM/EM). A metodologia cromatográfica utilizada nesse processo está descrita na Tabela 03.

Tabela 03: Metodologia empregada na análise de CLAE-DAD.

Equipamento	CLAE, Shimadzo Class-LC 10
Detector	DAD
Modo de eluição	Gradiente exploratório (5% a 100% de B em 25 min, 25-30 min em 100%, 30-33 min retorna a condição inicial, 33-48 min permanece em 5% de B para o reequilíbrio)
Taxa de fluxo	1 mL min ⁻¹
Fase estacionária	Monolítica C18 (Phenomenex Onyx monolítica, ODS, 100 x 4,60 mm, mesoporos 13 nm e macroporos 2 µm)
Fase Móvel	Água MiliQ (A):Metanol (B)
Volume de injeção	20 µL

3.10.1. Metodologia empregada na análise de CLAE-EMAR

As condições cromatográficas foram às mesmas citadas anteriormente, e para o EM: o eluente da coluna foi dividido através de um *splitter* numa proporção 4:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre m/z 50 e m/z 800 e as análises foram realizadas no modo de ionização positivo.

Foram analisadas todas as possibilidades para a formação dos íons precursores que poderiam ser cátions formados pela formação de adutos catiônicos (modo de ionização positiva) com H^+ , Na^+ ou K^+ , entre outros.

Para a detecção *in silico*, a análise dos dados obtidos por CLAR-EMAR foi realizada utilizando o *software* Bruker Data Analysis versão 3.2 conjugada com as bases de dados METLIN e ECMDB.

As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando uma seringa (100 μ L) adaptada a uma bomba de infusão com fluxo de 100 μ L.h⁻¹. O capilar foi aquecido a 150° C com fluxo de gás nebulizante 4L.min⁻¹ e 4 kV. Para a aquisição de dados foi utilizado o *software* Bruker Data Analysis, versão 3.2. A calibração interna foi realizada utilizando uma solução de Na-TFA (10 mg.mL⁻¹).

3.10.2. Metodologia empregada na análise de CLAE-EM/EM

As análises de espectrometria de massas sequencial foram obtidas em condições similares aos itens 3.10. e 3.10.1. Os parâmetros de operação instrumental para aquisição dos dados foram: energia do capilar: 4,500 kV; temperatura de dessolvatação: 450° C; gás de nebulização: 10 psi e energia de colisão de 25 eV.

Resultados e Discussões

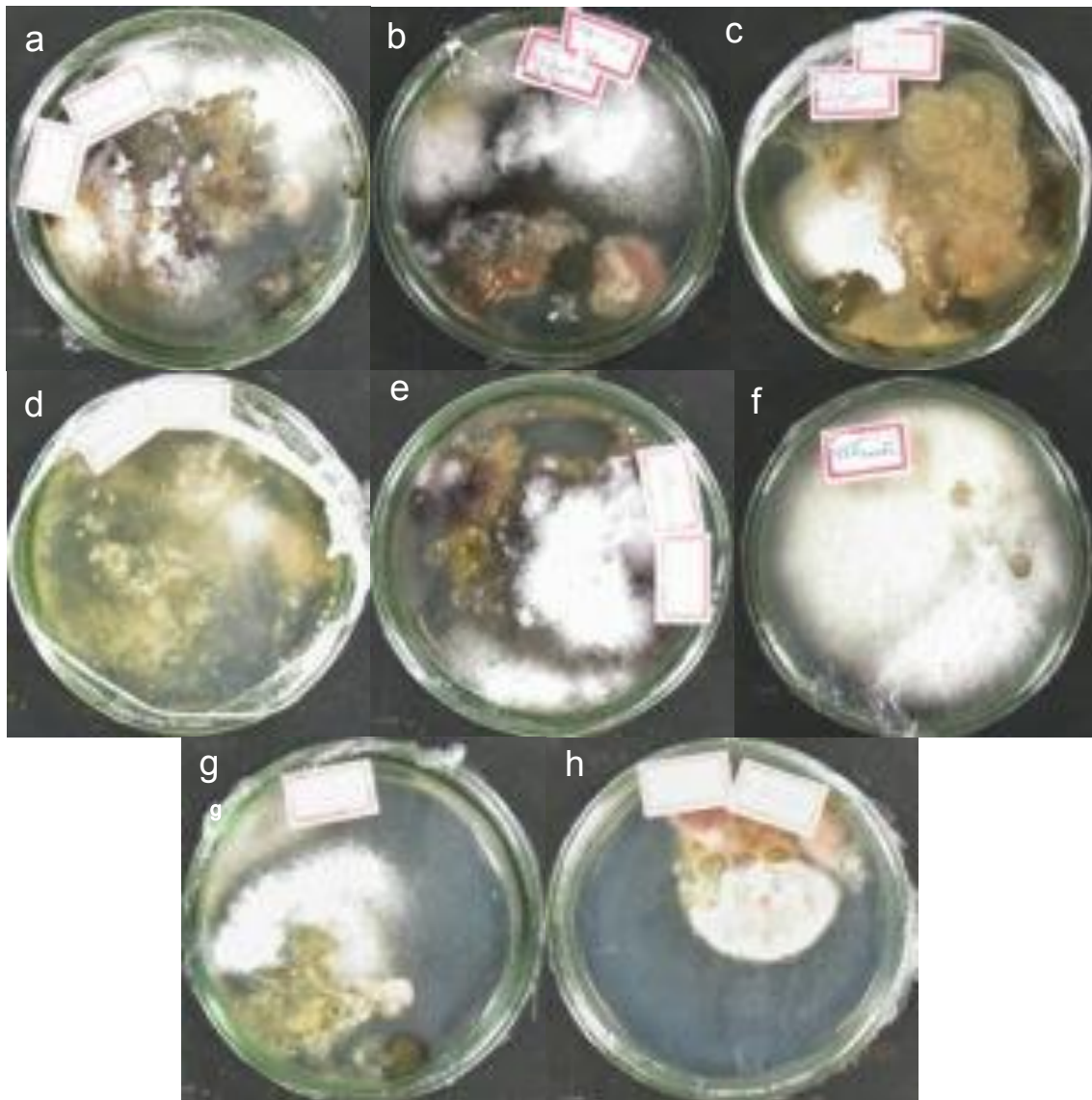
4. Resultados e Discussões

4.1. Micro-organismos isolados da rizosfera

A primeira coleta realizou-se quinze dias após o início da hidroponia, sendo que a composição da solução era de acordo com a proposta por Clark (Tabela 1), e proporcionou a obtenção de diversos micro-organismos associados às raízes das mudas de *Senna spectabilis* sendo a maioria composta por fungos filamentosos. Neste experimento pode-se observar que as plantas, apesar de cultivadas em vasos diferentes (nove vasos com duas mudas cada), são muito parecidas quanto à associação dos micro-organismos, uma vez que o perfil visto nas placas de petri após o período de incubação é bastante similar. Foram coletadas oito amostras em duplicata para cada meio de cultura no qual foi posteriormente inoculado, à exceção da solução contida no vaso número cinco, que no dia da coleta, estava muito verde e turvo, devido a proliferação de algas e não foi extraída para o plaqueamento.

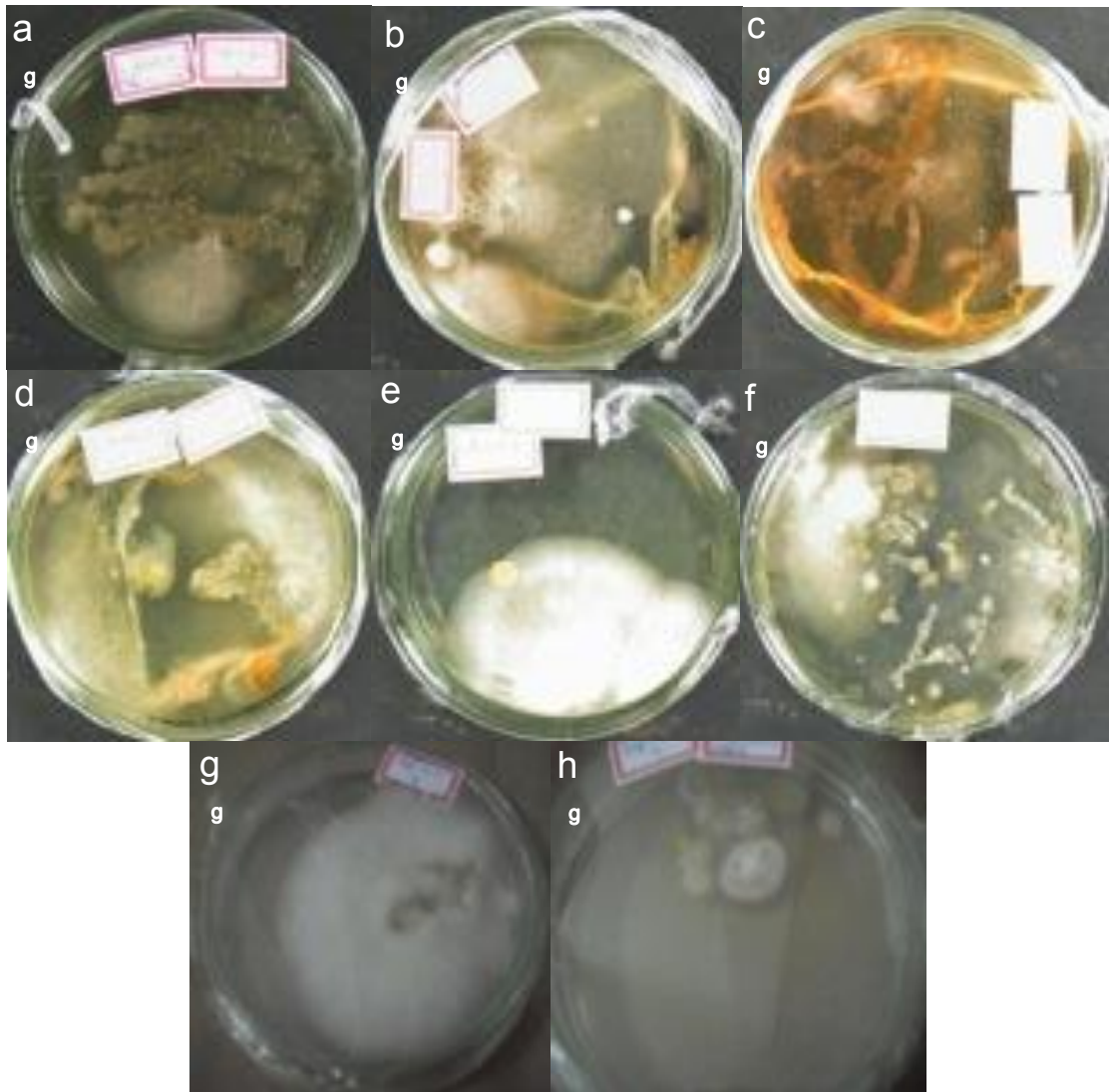
As placas contendo nutriente ágar mostraram uma variedade de fungos diretamente associados e de difícil separação para o seu isolamento (Figura 17).

Figura 17: Placas, nutriente ágar, com dez dias de incubação após serem inoculadas com solução nutritiva coletada das mudas de *Senna spectabilis*: a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 6; f) vaso 7; g) vaso 8 e h) vaso 9.



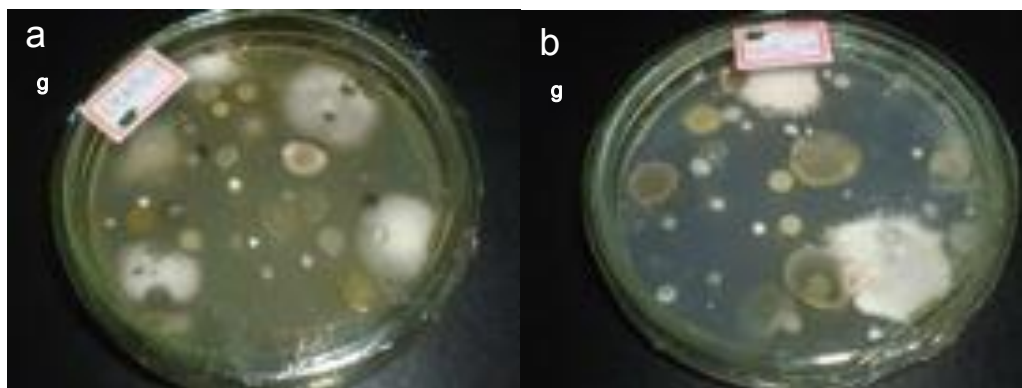
Nas placas contendo o meio Czapek-dox observou-se um menor número de organismos quando comparado ao meio nutriente, e também maior proliferação de bactérias (Figura 18). Destas placas os actinomicetes presentes nas placas do vaso dois, seis e sete não foram isolados porque não se desenvolveram ao serem repicados.

Figura 18: Placas com Czapek-dox ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de *Senna spectabilis*: a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 6; f) vaso 7; g) vaso 8 e h) vaso 9.



Ambas as placas com meio Nutriente e Czapek-dox mostraram-se diferentes quando comparadas às placas controle (placas expostas ao ar na casa de vegetação durante o período de coleta das amostras), como podemos observar na Figura 19. Os organismos aqui encontrados são fungos e bactérias de aspectos diferentes dos encontrados nas placas anteriormente citadas.

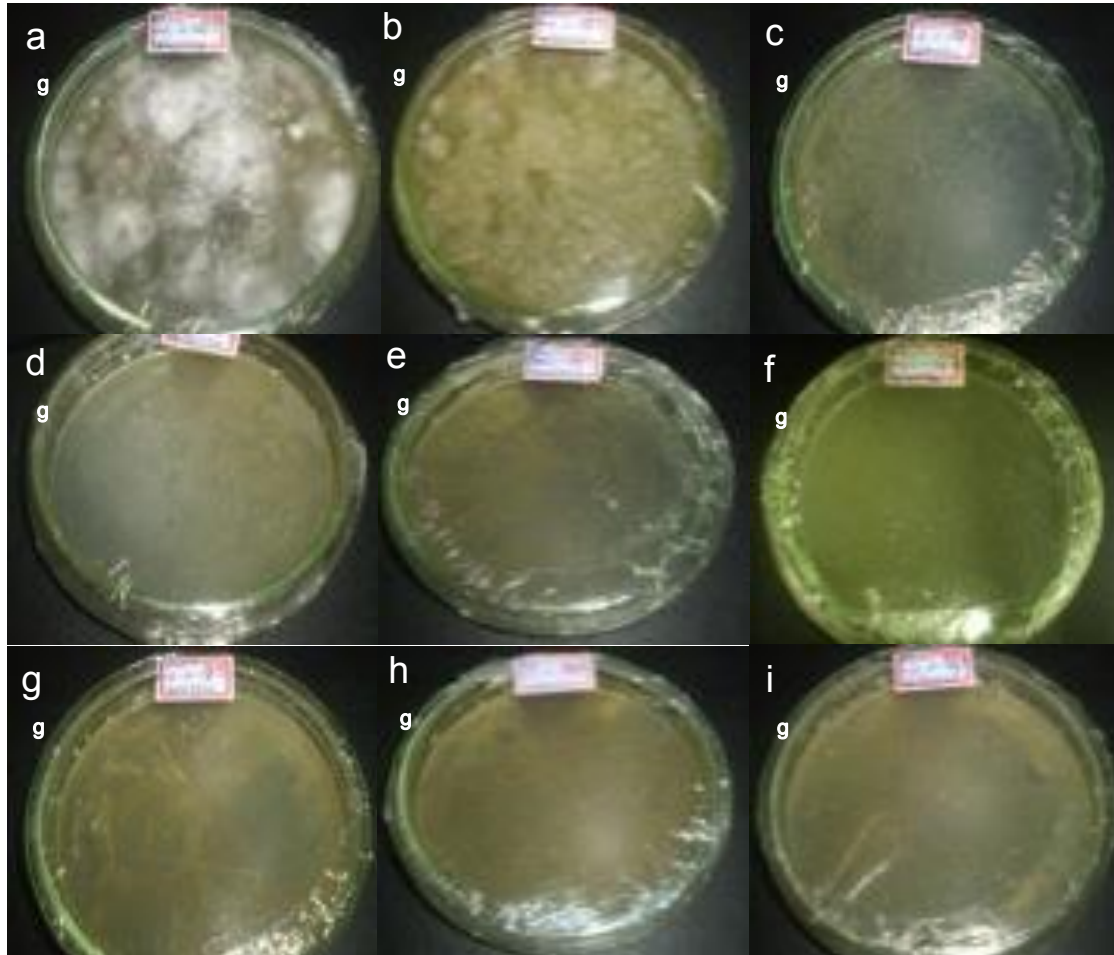
Figura 19: Placas, nutriente ágar, inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de *Senna spectabilis*: a) controle ar, meio czapek-dox e b) controle ar, meio Nutriente.



Estes micro-organismos não foram isolados, apenas serviram de controle de assepsia e para comprovar a não contaminação por organismos que não estivessem presentes na rizosfera das plântulas em cultivo.

A segunda coleta foi realizada após noventa dias de cultivo no meio hidropônico, dez dias após o estresse sofrido pela planta devido à alta temperatura na casa de vegetação. A solução aqui é a baseada na composição de Hoagland (Tabela 2), portanto, a concentração dos nutrientes é diferente da que se encontrava na primeira coleta. Observamos uma diferença quando comparamos com os organismos isolados no primeiro experimento (primeira coleta), o que mostra a mudança da população microbiana de acordo com os fatores ambientais, como temperatura, umidade do ar e ainda, no caso dos micro-organismos rizosféricos, da concentração de nutrientes e exudatos liberados pela planta (Figura 20).

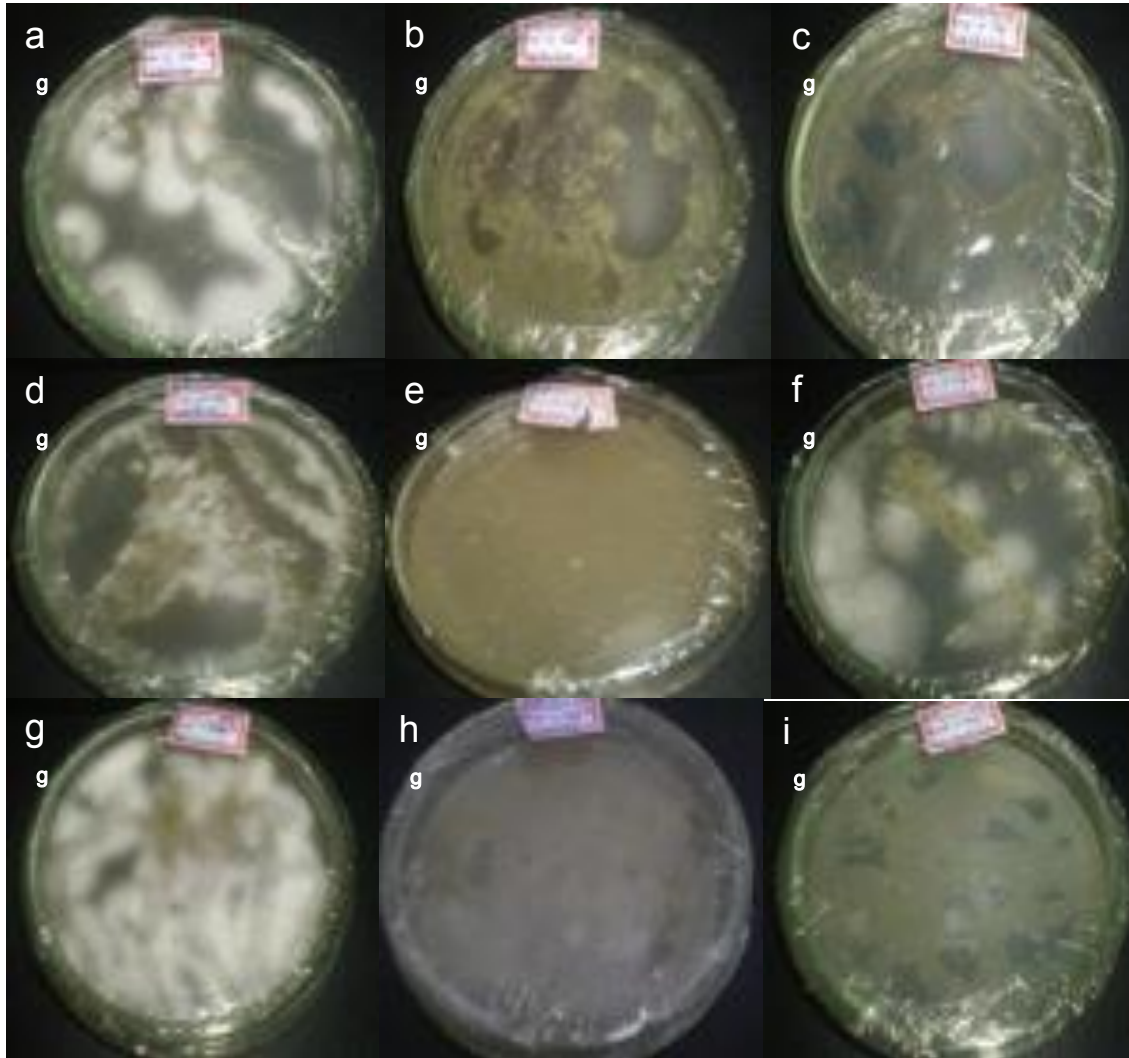
Figura 20: Placas com nutriente ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de *Senna spectabilis*: a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 5; f) vaso 6; g) vaso 7 h) vaso 8 e i) vaso 9.



Há uma predominância de bactérias e/ou leveduras, sendo que fungos ocorreram apenas na placa proveniente do vaso um. As demais placas são similares, por exemplo, placas sete e nove; três e cinco, com poucos micro-organismos presentes.

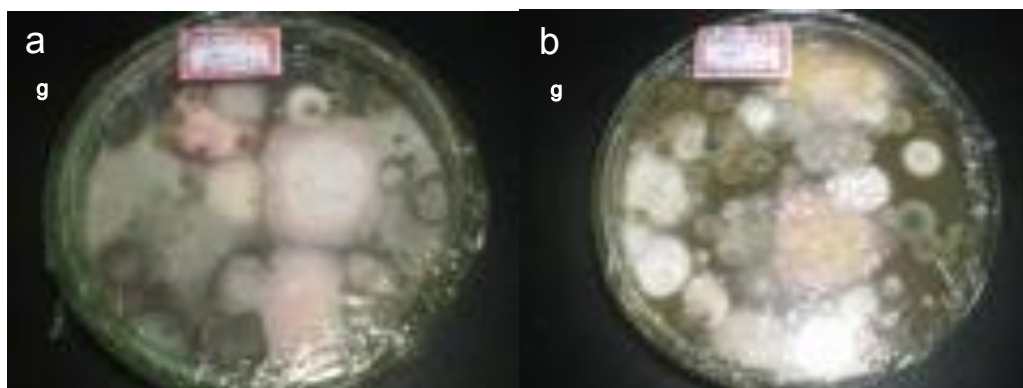
As placas cultivadas no meio czapek-dox se mostraram diferentes daquelas observadas no primeiro experimento e também houve predominância de bactérias. Além disso, poucos organismos cresceram nas placas (Figura 21).

Figura 21: Placas com czapek-dox ágar com 10 dias de incubação após serem inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de *S. spectabilis*: a) vaso 1; b) vaso 2; c) vaso 3; d) vaso 4; e) vaso 5; f) vaso 6; g) vaso 7 h) vaso 8 e i) vaso 9.



Ambas as placas com meio nutriente e czapek-dox mostraram-se diferentes quando comparadas às placas controle (placas expostas ao ar na casa de vegetação durante o período de coleta das amostras), como pode ser observado na Figura 22. Estes micro-organismos não foram isolados, apenas serviram de controle de assepsia e para comprovar a não contaminação por organismos que não estivessem presentes na rizosfera das plântulas em cultivo.

Figura 22: Placas, nutriente ágar, inoculadas com a solução nutritiva coletada das mudas de *S. spectabilis*: a) controle ar, meio czapek-dox e b) controle ar, meio nutriente.



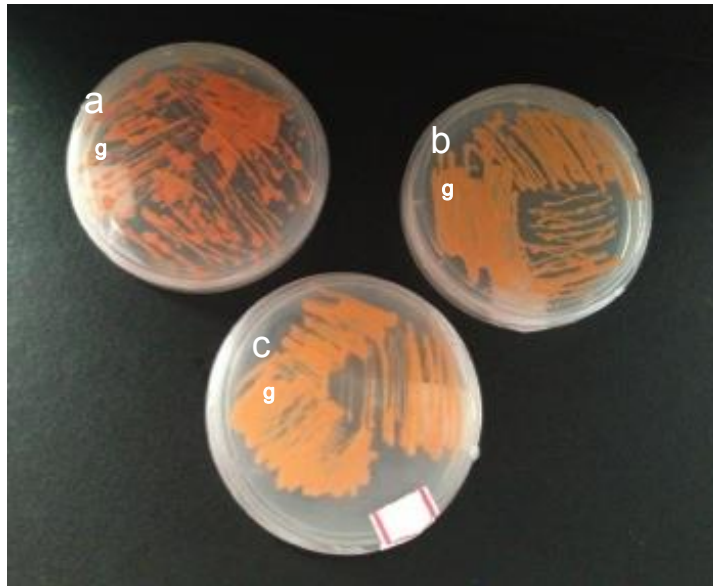
Observamos uma diferença quando comparamos com os organismos controle da primeira coleta (Figura 19), o que mostra a mudança da população microbiana de acordo com os fatores ambientais, como temperatura e umidade do ar.

A terceira coleta foi processada cento e cinquenta dias do início do cultivo. As condições de cultivo, solução nutritiva, na qual se encontrava as plantas, é a mesma da segunda coleta; assim como o procedimento para isolamento dos micro-organismos. Observamos neste experimento, uma microbiota muito similar à obtida na época da segunda coleta.

Todos os micro-organismos crescidos nas placas dos dois meios de cultura das três coletas foram submetidos ao processo de isolamento, e aqueles nos quais foi possível obter a linhagem pura foram armazenados em frascos de penicilina contendo água destilada estéril e os respectivos meios de cultura para bactérias.

No total foram isolados cento e vinte e nove fungos e cinquenta e uma bactérias de todas as coletas no cultivo hidropônico. Dentre as cinquenta e uma bactérias isoladas, foram escolhidas três para o presente trabalho, denominadas de CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b (Figura 23).

Figura 23: Imagem das colônias das linhagens a) CSP-50a, b) CSP-52b, c) CSP-53b.



4.2. Teste de Gram

As três linhagens de bactérias pré-selecionadas foram submetidas ao teste de Gram, o qual separa as bactérias em dois grandes grupos (Gram positivo e Gram negativo) baseando-se na composição da parede bacteriana.

Figura 24: Imagem em lamina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-50 a.

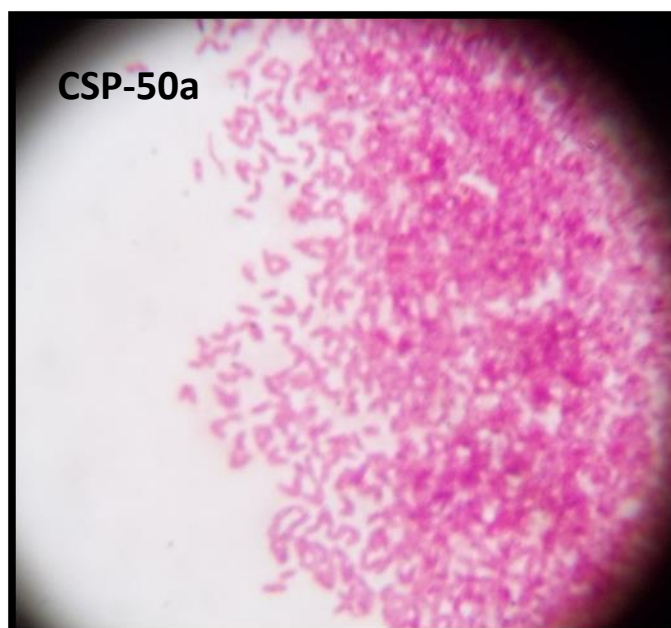


Figura 25: Imagem em lamina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-52b.

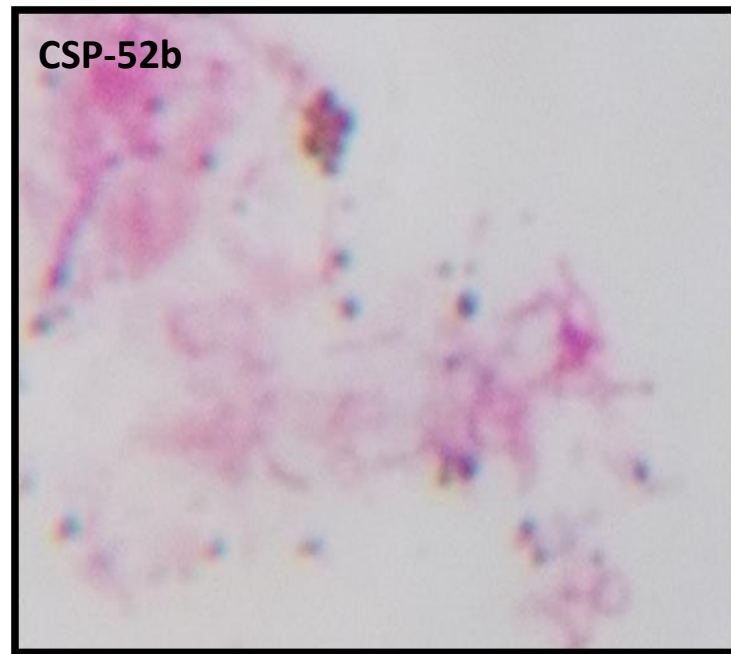
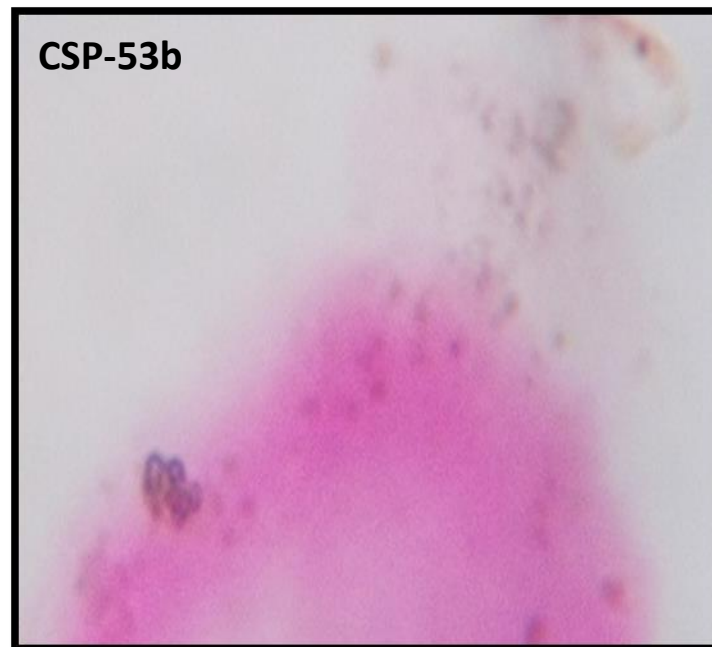


Figura 26: Imagem em lamina por microscópio ótico de campo claro, da linhagem CSP-53b.



As bactérias CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b, apresentaram coloração da safranina (vermelho), portanto, o solvente orgânico retirou o complexo cristal violeta-iodo, indicando que são linhagens Gram-negativas.

4.3. Identificação filogenética das culturas isoladas de bactérias

4.3.1. Extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA pela PCR

A Tabela 4 mostra que a fervura da biomassa foi adequada para a extração de DNA das três amostras com quantidade e qualidade adequadas, determinadas no equipamento Nanodrop, segundo o manual do equipamento, a relação 260/280 é utilizada para verificar a pureza do material genético uma vez que os ácidos nucleicos apresentam absorvância máxima a 260 nm e proteínas a 280nm. Relação 260/280 superior a 1,8 indica DNA de boa qualidade.

Tabela 04: Quantidade e qualidade do DNA extraído das amostras das culturas isoladas de bactérias

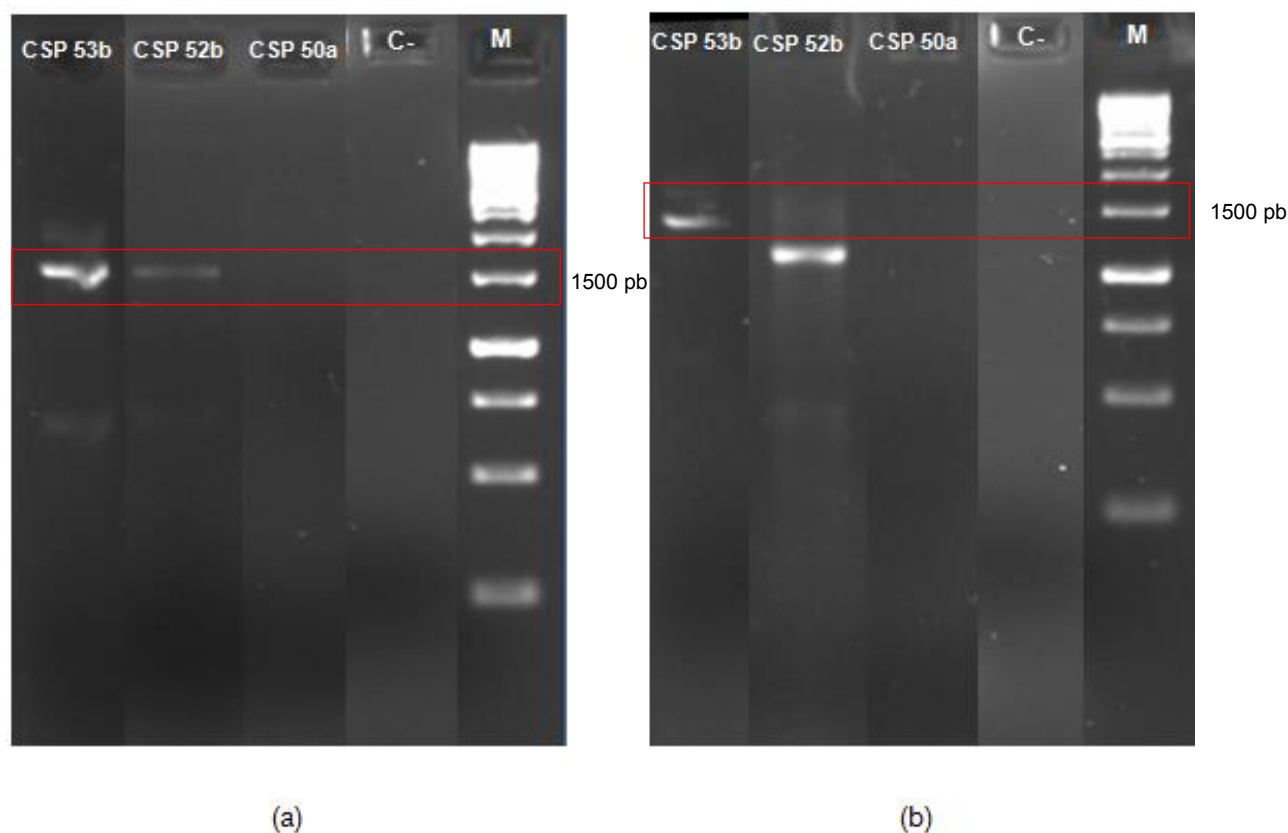
Amostras	DNA (ng/μL)	Pureza 260/280
CSP-53b	101,9	2,82
CSP-52b	96,8	3,05
CSP-50a	201,8	3,33

A relação 260/280 foi sempre superior a 1,8 indicando DNA de qualidade adequada para as reações de PCR, sem a necessidade de purificação.

A Figura 9 a e b mostra os produtos amplificados na reação da PCR utilizando o par de primers Ft1(F) e Rd1(R) com 3 μL e 5 μL de DNA, respectivamente. Por esta Figura observa-se que a reação de PCR realizada com 3 μL de DNA apresentou resultados melhores quando comparada com a realizada com 5 μL de DNA. Isto mostra que nas condições da PCR para as amostras estudadas, maior quantidade de DNA interferiu negativamente na reação. Observou-se também que os produtos amplificados foram de tamanho e qualidade adequados com a detecção

de uma banda bem nítida na altura do marcador molecular correspondendo a 1500 pb. As bandas inespecíficas menos intensas na posição abaixo dos 1500 pb pode ser decorrente, por exemplo, de erro na extensão dos *primers*, que pode ser corrigido, variando as condições de reação, tais como a concentração de cloreto de magnésio, aumento da temperatura e tempo de desnaturação, aumento da temperatura de anelamento, do tempo de extensão, bem como a utilização de *primers* mais específicos. Para o sequenciamento, recortar a banda de interesse e purificar seria outra alternativa. No entanto, como houve o aparecimento de uma única banda inespecífica e de baixa intensidade, optou-se por realizar o sequenciamento com o produto obtido diretamente da PCR realizada com 3 μ L de DNA para as amostras um e dois, para a amostra três não houve a amplificação do DNA (ausência de banda) por tanto não foi possível o sequenciamento.

Figura 27: Produtos da PCR amplificados com o *set* de *primers* Ft1(F) e Rd1(R) para as amostras (1 a 3) contendo 3 μ L (a) e 5 μ L (b) de DNA, C- (controle negativo), M (marcador molecular). *(1500pb).



4.3.2. Identificação filogenética

A qualidade do sequenciamento dos produtos da PCR tanto no sentido *forward* quanto no *reverse* foi adequada, exceto para a amostra três (Tabela 5), não houve amplificação do DNA (Figura 9). Ao *blastar* as sequências, tanto para o sentido *forward* quanto para o *reverse*, com as depositadas no banco de dados, as afiliações filogenéticas foram às mesmas.

Tabela 05: Resultados de coloração e identificação das culturas isoladas pela sequência parcial dos genes 16S rRNA obtidas nos sentido *forward* ou *reverse* com o Blastn.

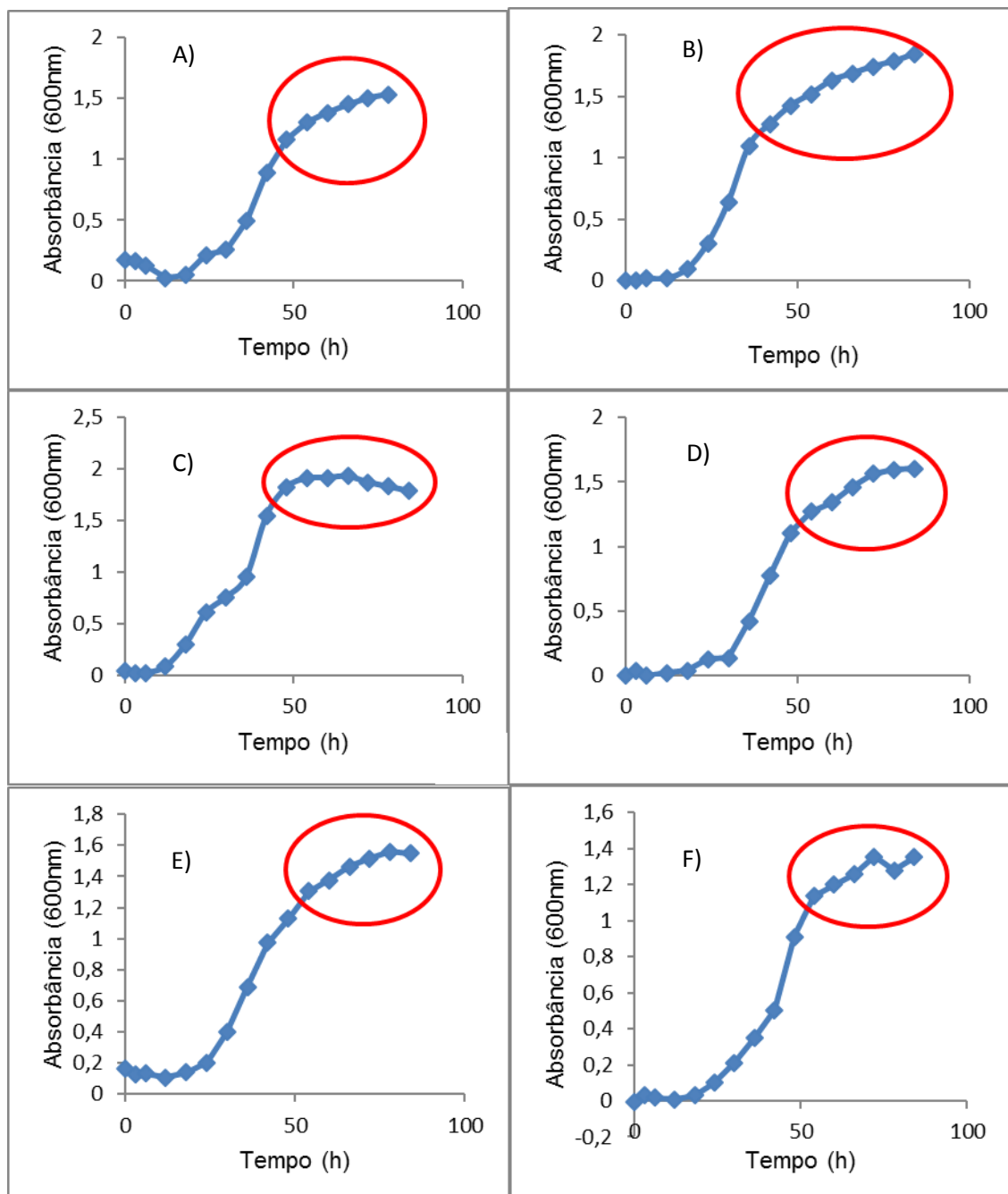
Amostras	Coloração de gram	Comprimento da sequência (pb)	Descrição no Gen Bank	Similar (%)	Gen Bank
CSP-53b	-	499	Unc. Shigella sp. clone Acro289	99	KC110 986.1
CSP-52b	-	427	Unc. Shigella sp. clone Acro289	99	KC110 964.1
CSP-50a	-	-	-	-	-

Ao comparar as sequências das culturas com as depositadas no banco de dados, observa-se que as sequências das amostras um e dois foram similares a bactérias presentes em solo do gênero *Shigella* que são bacilos não moveis, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencem a família Enterobacteriaceae, intimamente relacionadas à *Escherichia coli* e *Salmonella*, e podem causar shigelose (*disenteria bactBlastneriana*) em humanos. Quatro espécies representam esse gênero; *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. A amostra três, não foi sequenciada, pois não se obteve amplificação na PCR.

4.4. Curvas de crescimento microbiano

As três linhagens de bactérias pré-selecionadas foram submetidas a ensaio de crescimento para a comparação das fases com a produção metabólica (Figura 28).

Figura 28: Curvas de crescimento das linhagens A) CSP-50a em Czapek; B) CSP-50a em Nutriente; C) CSP-52b em Czapek; D) CSP-52b em Nutriente; E) CSP-53b em Czapek; F) CSP-53b em Nutriente.



O conhecimento da cinética de crescimento microbiano é importante para se conhecer o ciclo biológico das linhagens, bem como a produção dos seus metabólitos. Os metabólitos primários são produzidos nas fases de intenso crescimento bacteriano (Log), já os metabólitos secundários são produzidos na fase estacionária.

Como a produção de metabólitos secundários acontece na fase estacionária (círculo em vermelho), foi possível obter os tempos de crescimento em que as linhagens atingem essa fase em cada meio de cultivo testado, como descritos na Tabela 6.

Tabela 06: Intervalo de tempo de cada linhagem em cada meio.

Linhagens	Intervalo de Extração (Fase Estacionária)	
	Czapek	Nutriente
CSP-50a	54-84 (horas)	48 -84 (horas)
CSP-52b	66-84 (horas)	48-84 (horas)
CSP-53b	66-84 (horas)	42-84 (horas)

4.5. Perfil cromatográfico (*Fingerprint*)

Para a elaboração do perfil cromatográfico, realizou-se primeiramente uma análise com os meios isolados antes da inoculação (branco), como mostrado na Figura 29. Em seguida, com os extratos pertencentes aos diferentes tempos de inoculação, permitindo assim a comparação do consumo dos nutrientes com a produção dos metabólitos (Figuras 30, 31 e 32).

Figura 29: Perfil cromatografico dos meios sem a inoculação das linhagens de bactéria (Branco), $\lambda = 254$ nm.

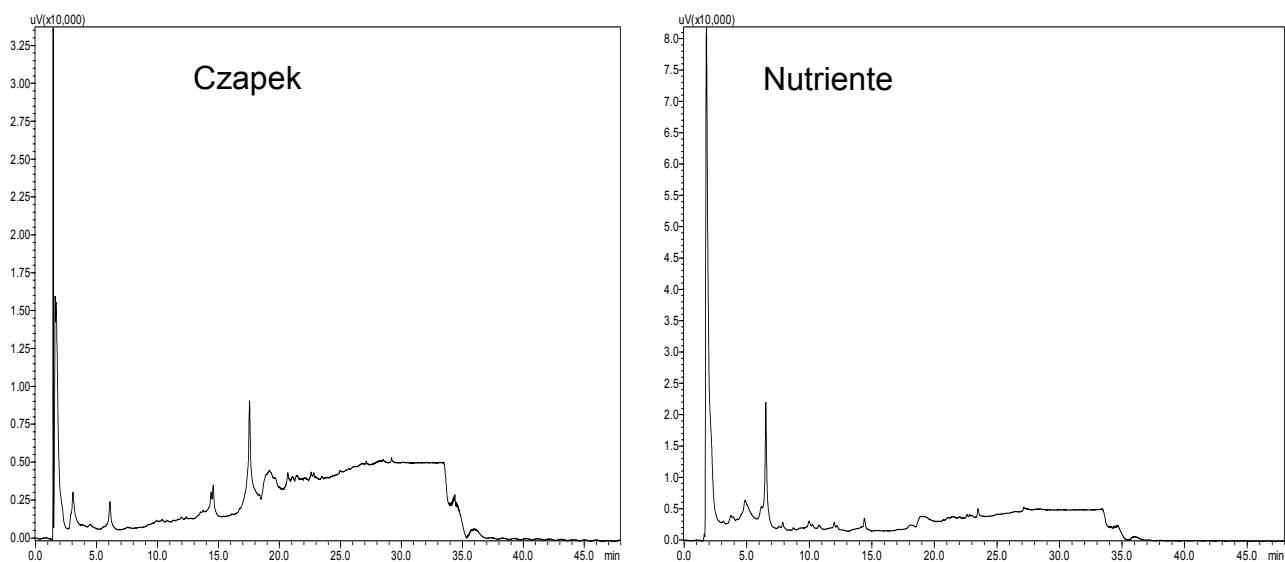


Figura 30: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Czapek, 54 horas (preto) e Nutri, 48 horas (azul), $\lambda = 254$ nm.

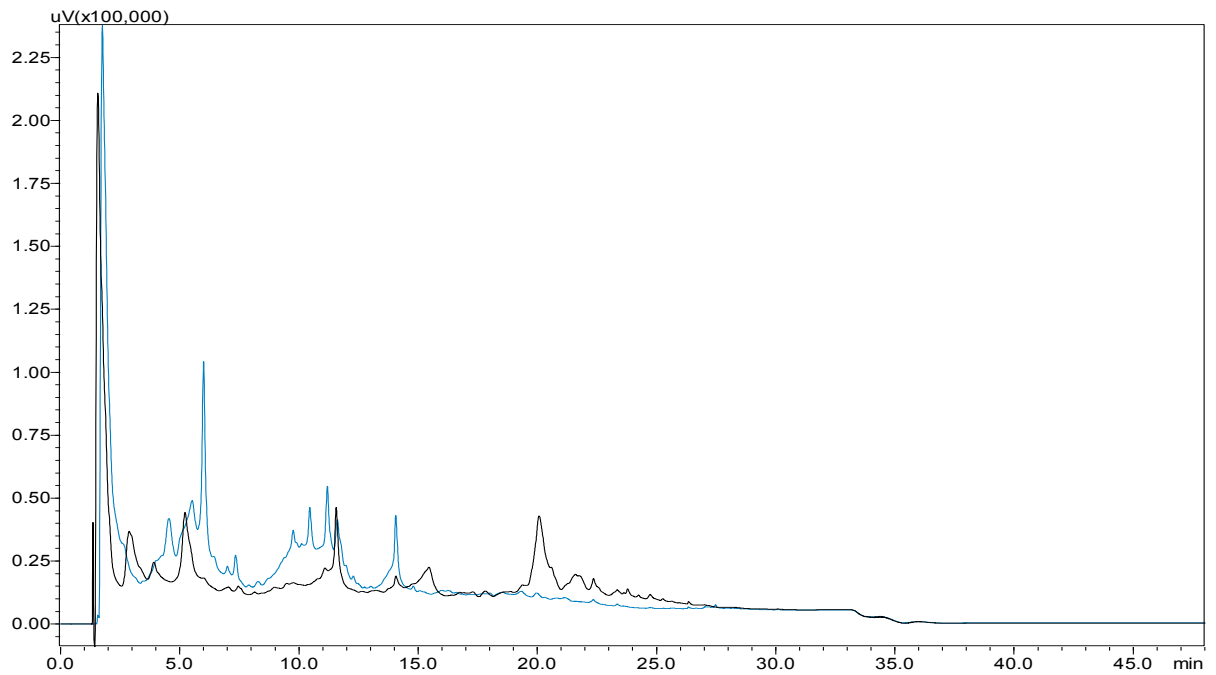


Figura 31: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Czapek, 66 horas (preto), Nutri, 48 horas (rosa), $\lambda = 254$ nm.

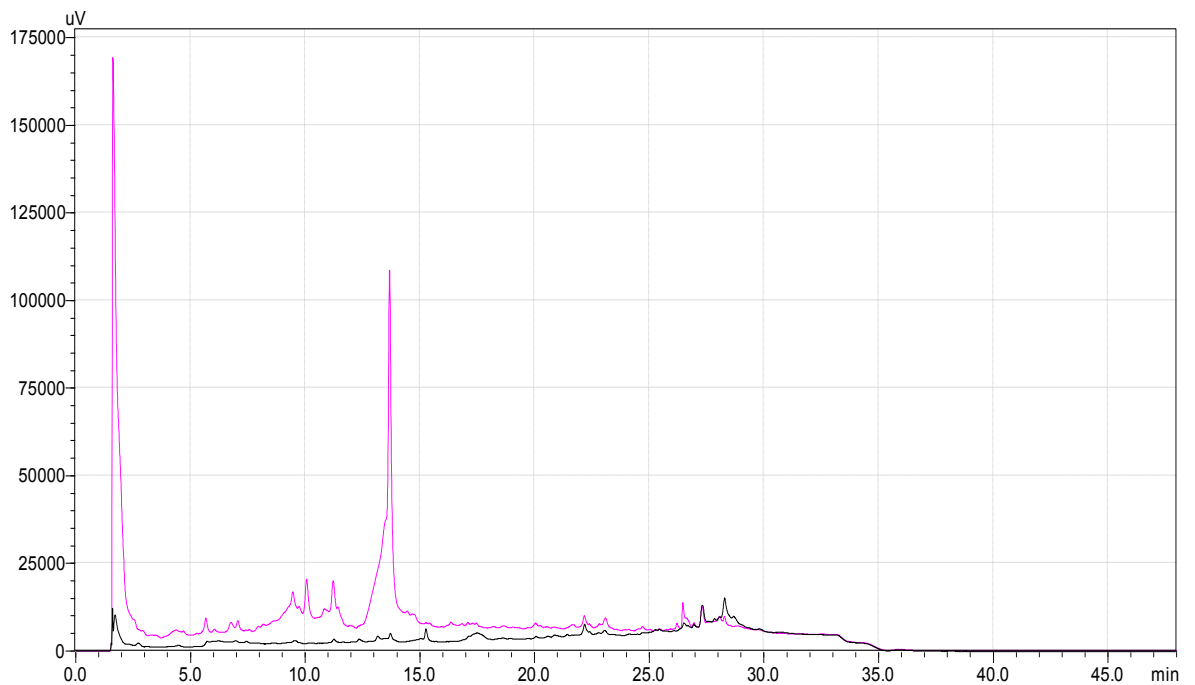
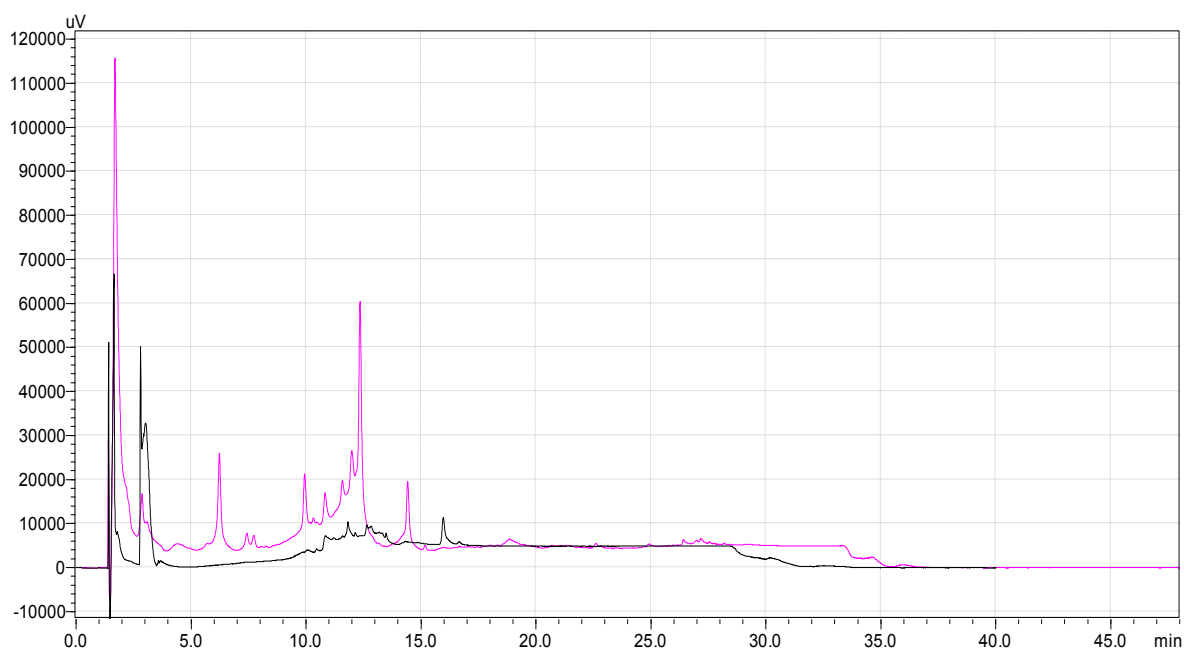


Figura 32: Perfil cromatografico da bacteria CSP-53b em Czapek, 66 horas (preto), Nutri, 42 horas (rosa), $\lambda = 254$ nm.



Pode-se notar a diferença dos perfis cromatográficos se comparados aos brancos das amostras, o que é indicativo de consumo de nutrientes e produção de metabólitos. As diferenças nos cromatogramas das amostras (Figuras 30, 31 e 32) devem-se aos distintos componentes presentes nos meios de cultura, mostrando que a alteração na composição do meio provoca variação na produção metabólica. As três linhagens de bactérias (CSP-50a, CSP-52b e CSP-53b) apresentaram uma maior diversidade de bandas cromatográficas a λ 254 nm em Nutriente e menor em Czapek, por tanto, esse meio foi escolhido para o crescimento dessas bactérias para as análises dos extratos.

As Figuras 33 e 34 comparam as amostras de bactéria CSP-50a em Czapek e Nutriente em diferentes tempos de crescimento, no início e final da fase estacionária.

Figura 33: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Czapek, com 54 (preto) e 84 horas (azul) de incubação, $\lambda = 254$ nm.

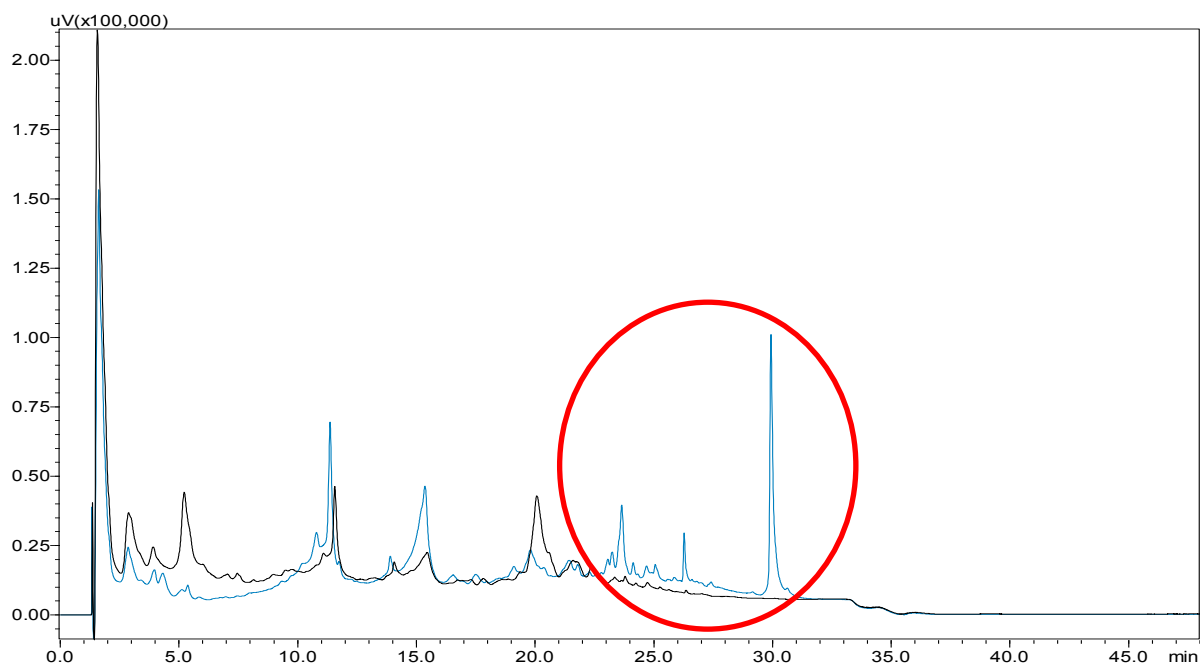
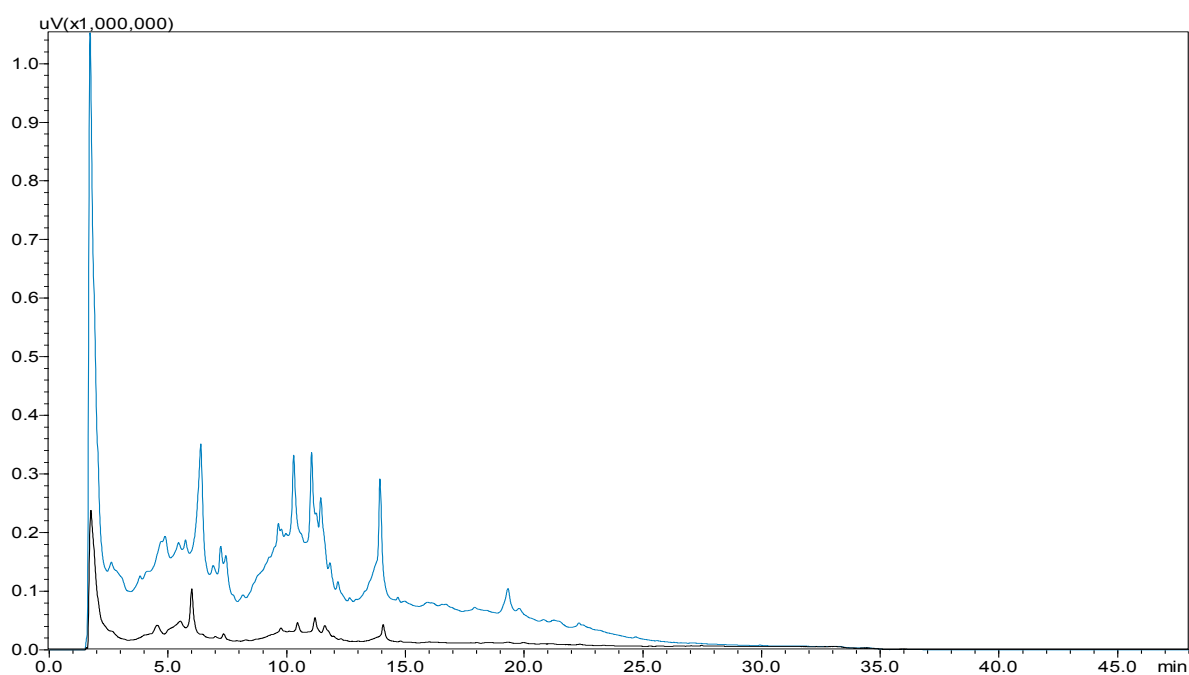


Figura 34: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-50a em Nutriente com 48 (preto) e 84 horas (azul) de incubação, $\lambda = 254$ nm.



Se compararmos a produção de metabólitos com o tempo de crescimento, podemos observar que no meio Czapek houve uma pequena mudança no perfil cromatográfico para linhagem CSP-50a, havendo maior produção de compostos apolares no final da fase estacionária, podendo ser devido a escassez de nutrientes, provocando uma biotransformação (consumo e produção de um metabólito em outro) garantindo a sobrevivência da linhagem, já em meio Nutriente não se observa mudanças no perfil. Talvez devido que o meio Nutri é mais rico em nutrientes, portanto, o intervalo de quarenta e oito a oitenta e quatro horas ainda não se atinge uma escassez nutricional, não havendo necessidade de mudança na produção metabólica dessa linhagem.

As Figuras 35 e 36 comparam as amostras de CSP-52b em meio Czapek e Nutriente respectivamente, no início e no final da fase estacionária.

Figura 35: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Czapek com 66 (preto) e 84 horas de incubação (rosa), $\lambda = 254$ nm.

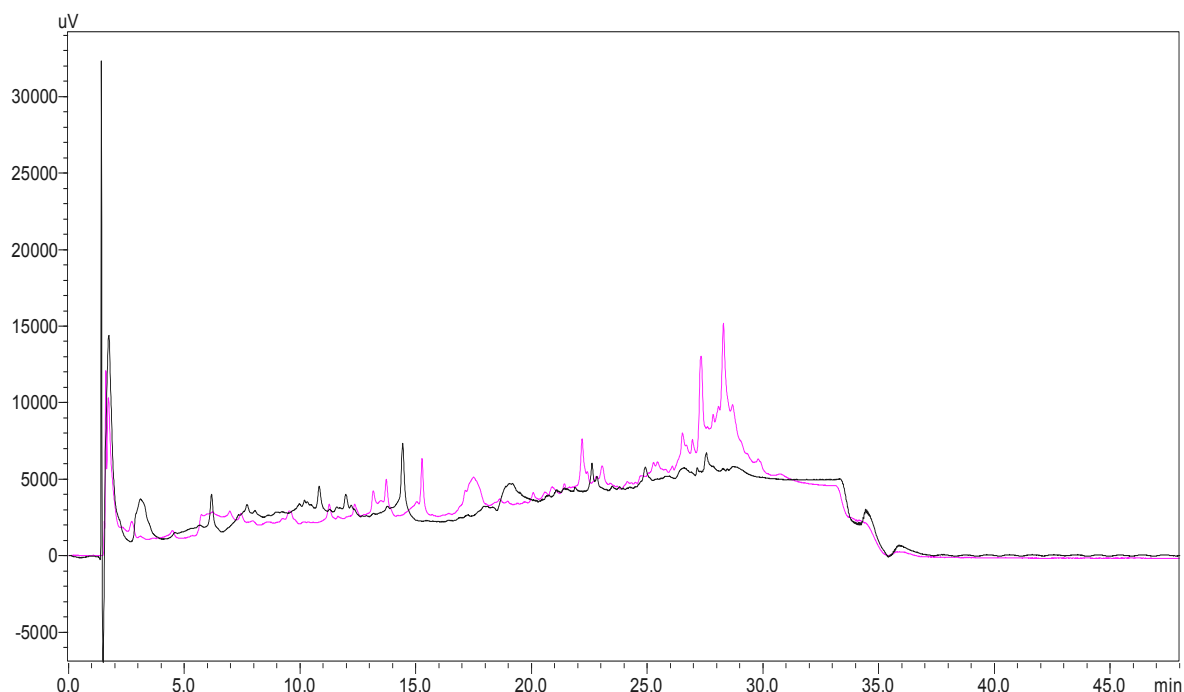
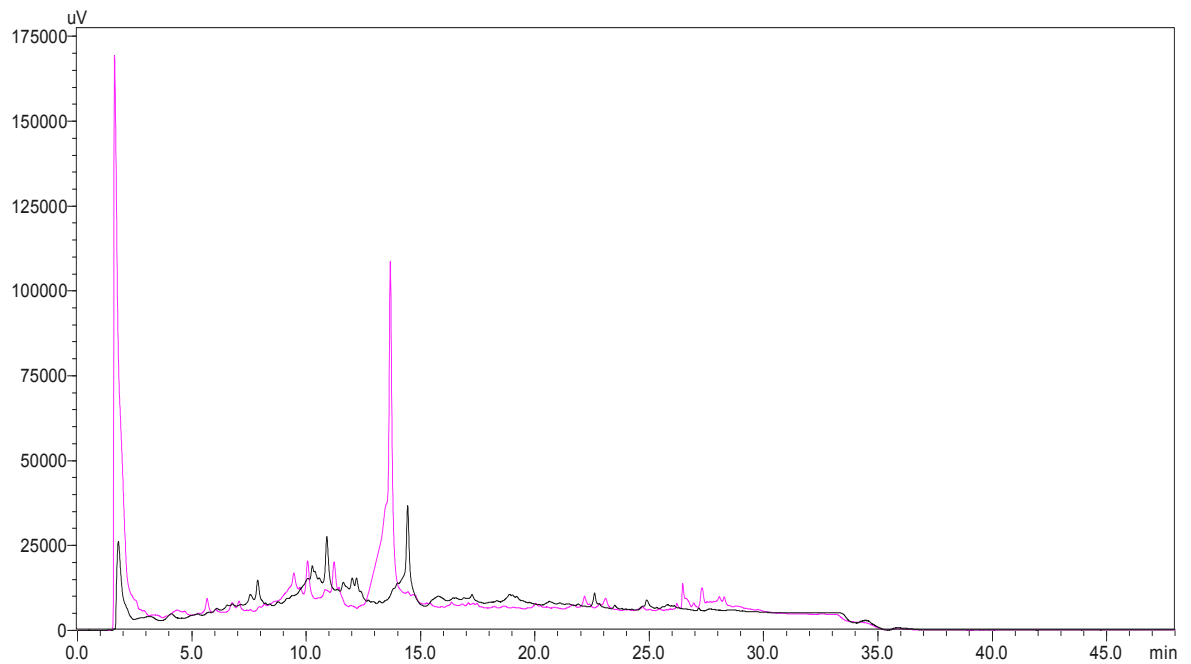


Figura 36: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-52b em Nutriente com 48 (preto) e 84 horas de incubação (rosa), $\lambda = 254$ nm.



Para essa linhagem não há mudanças significativas nos intervalos de tempo selecionados para os dois meios de cultivo (Czapek e Nutriente). Podendo ser que nesse intervalo de crescimento essa bactéria não passou por um período de escassez nutricional, não havendo necessidade de mudanças na produção metabólica.

As Figuras 37 e 38 comparam as amostras de CSP-53b em meio Czapek e Nutriente respectivamente, no início e no final da fase estacionária.

Figura 37: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-53b em Czapek com 66 (preto) e 84 horas de incubação (rosa), $\lambda = 254$ nm.

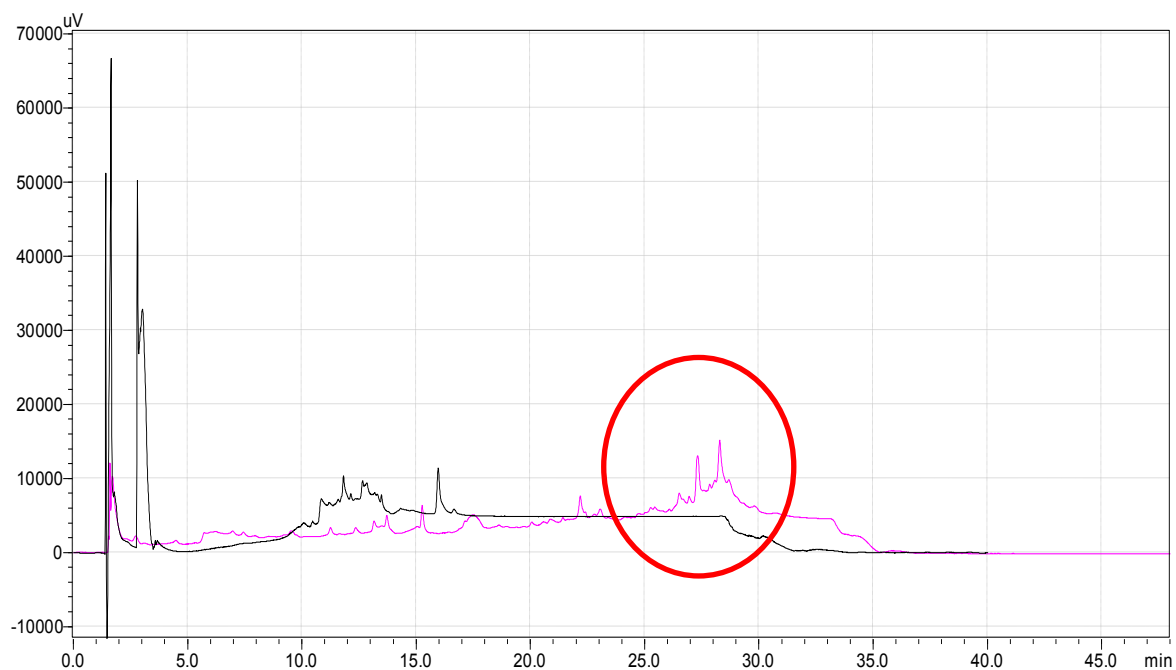
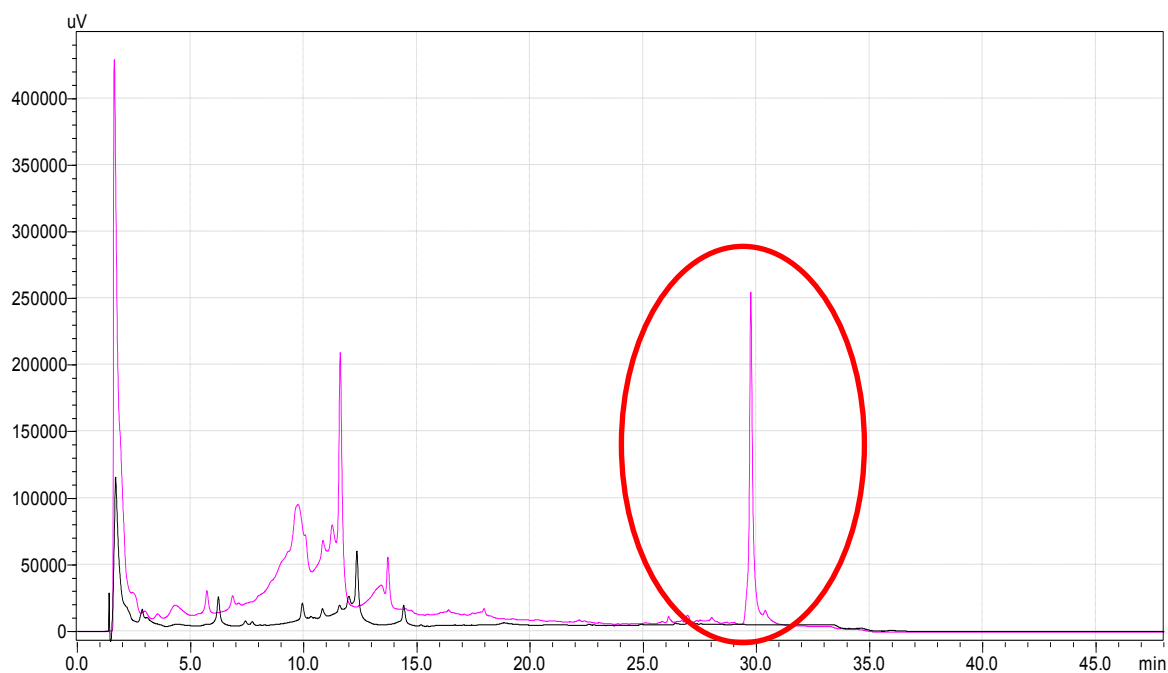


Figura 38: Perfil cromatográfico da bactéria CSP-53b em Nutriente com 42 (preto) e 84 horas de incubação (rosa), $\lambda = 254$ nm.

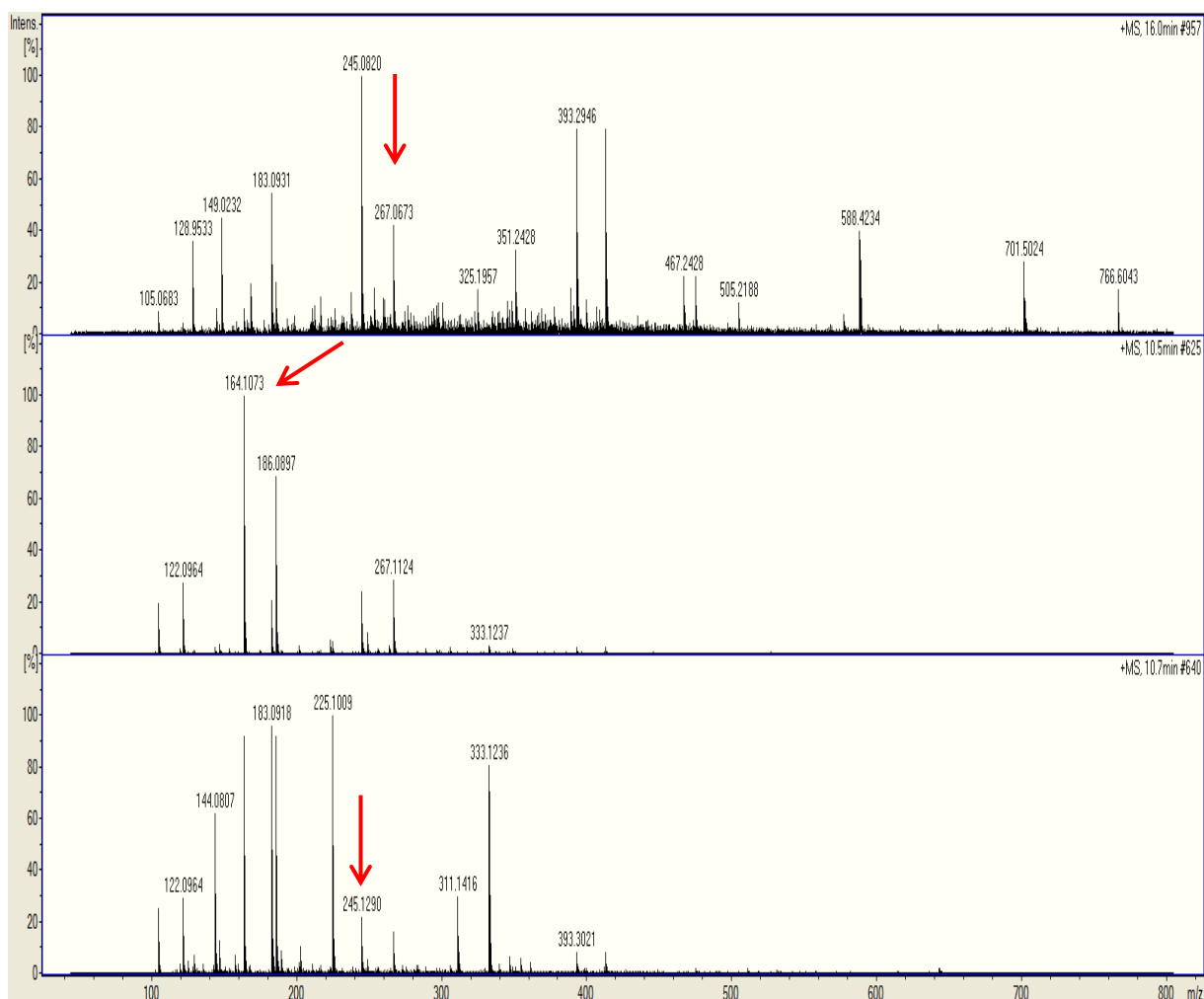


Para a linhagem CSP-53b, há uma pequena mudança no perfil no final da corrida para ambos os meios de cultura (Czapeck e Nutriente), podendo ser devido quem nesse intervalo de crescimento (66 horas – 84 horas, Czapeck e 42 horas – 84 horas, Nutriente) houve uma escassez de nutriente, exigindo à bactéria a biotransformar algum dos seus metabólitos, na tentativa de manter a sobrevivência da linhagem.

4.6. Desreplicação – CLAE-ESI-MS

Devido a dificuldade na produção de quantidades expressivas de extrato, para o isolamento, optou-se pela tentativa de detecção em mistura. Para tanto foi realizada a análise por CLAE-ESI-MS dos extratos das linhagens CSP-50a (Figura 39), CSP-52b (Figura 46) e CSP-53b (Figura 49) em meio Nutriente. Adicionalmente, foram realizadas as análises de MS sequencial de vários íons correspondentes a metabólitos.

Figura 39: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-50a em meio nutriente, a) $t_r = 16$ minutos, b) $t_r = 12$ minutos, c) 10,3 minutos.



Os íons de m/z 267,0673, m/z 164,1073 e m/z 245,1290 foram escolhidos devido a ausência no meio de cultivo (Branco) e submetidos a análises por MS sequencial (Figuras 40, 41 e 42) e depois, foi realizada uma busca em bancos de dados disponíveis

Figura 40: Fragmentação do íon precursor de m/z 267,0673 por ESI-MS. Energia de colisão de 25 eV.

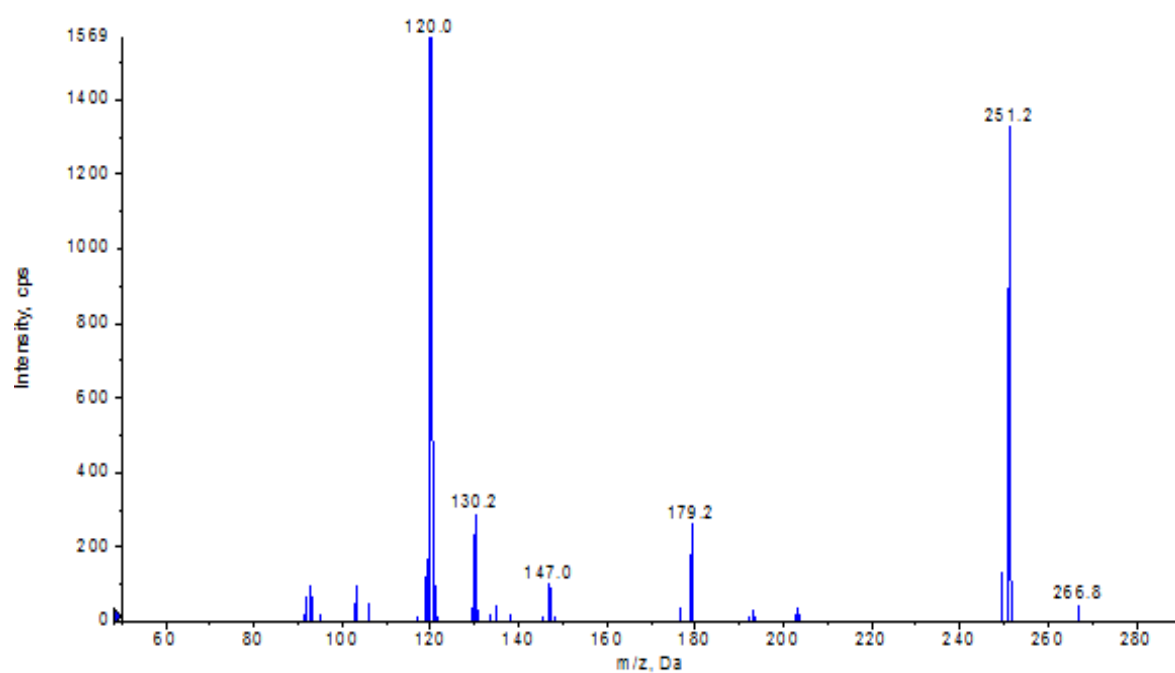


Figura 41: Fragmentação do íon precursor de m/z 164,1073 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

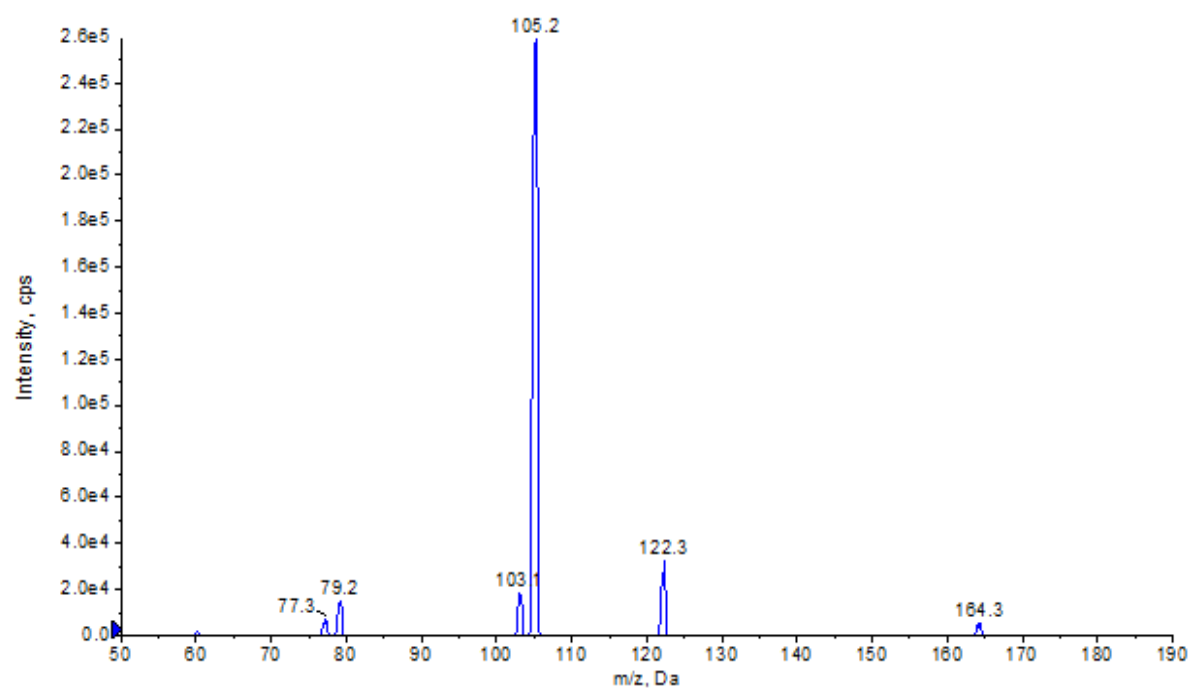


Figura 42: Fragmentação do íon precursor de m/z 245,1290 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

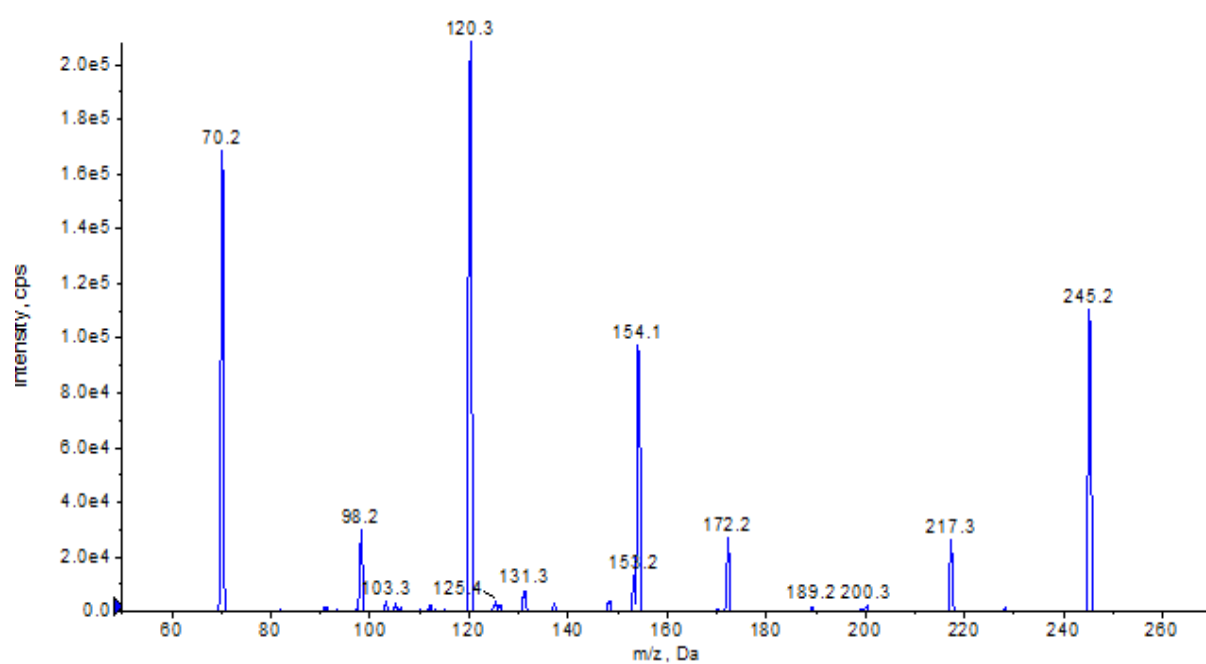


Tabela 07: Resultado da base de dados do íon m/z 267,0673.

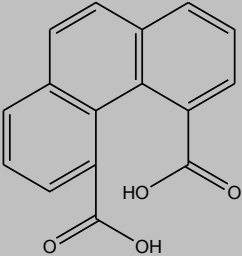
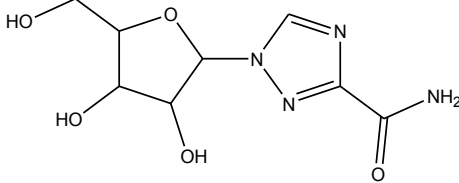
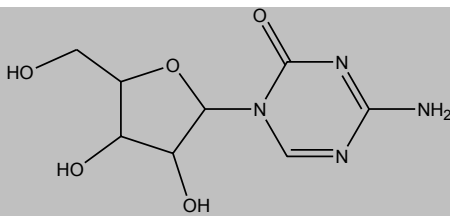
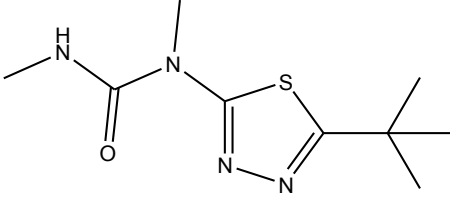
Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 267,0652	$C_{16}H_{10}O_4$		Phenanthreno-4,5-dicarboxilato (CAS:5462-82-8)	7
Metlin	$[M+Na]^+$ 267,0700	$C_8H_{12}N_4O_5$		Ribavirina (CAS:36791-04-5)	10
ECMDB	$[M+Na]^+$ 267,0700	$C_8H_{12}N_4O_5$		Azacitidina (CAS:320-67-2)	10
Metlin	$[M+K]^+$ 267,0676	$C_9H_{16}N_4OS$		Tebuthiuron (CAS:34014-18-1)	1

Tabela 07: Continuação.

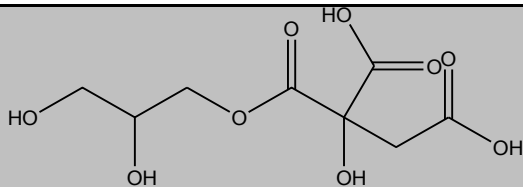
Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 267,0711	$C_9H_{14}O_9$		Citrato monoglicerideo CAS:36291-32-4	14

Tabela 08: Resultado da base de dados do íon *m/z* 164,1073.

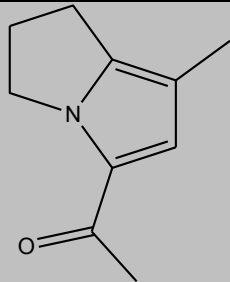
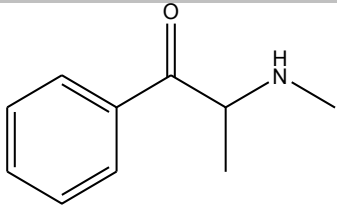
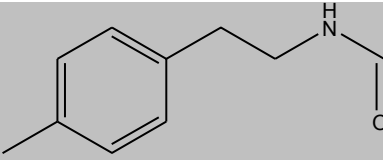
Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 164,1070	$C_{10}H_{13}NO$		5-acetil-2,3-dihidro-7- metil-1-pirrolizina CAS:80933-77-3	1
Metlin	$[M+H]^+$ 164,1070	$C_{10}H_{13}NO$		Metcatinona	1
Metlin	$[M+H]^+$ 164,1070	$C_{10}H_{13}NO$		-	1

Tabela 08: Continuação.

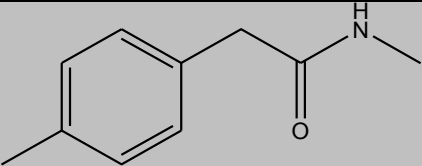
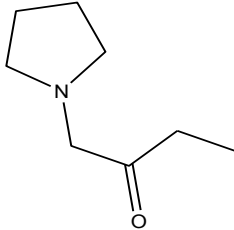
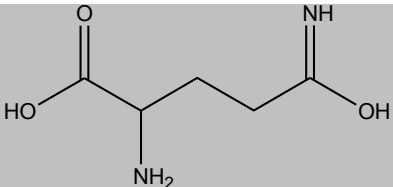
Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 164,1070	$C_{10}H_{13}NO$		-	1
Metlin	$[M+Na]^+$ 164,1046	$C_8H_{15}NO$		1-pirrolidil-2-butanona CAS:97073-14-8	16
ECMDB	$[M+H]^+$ 164,1030	$C_5H_{10}N_2O_3$		L-glutamina	-

Tabela 09: Resultado da base de dados do íon m/z 245,1290.

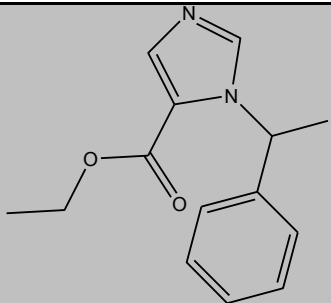
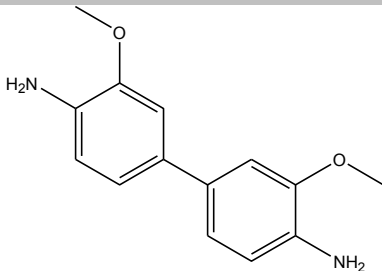
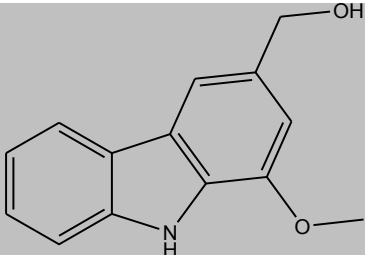
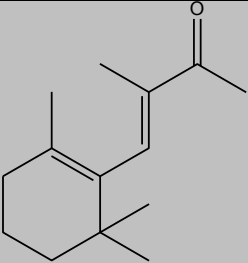
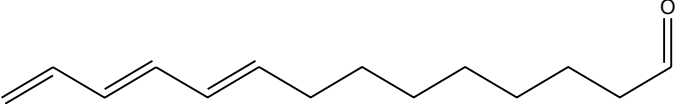
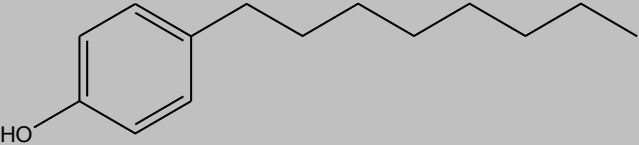
Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 245,1285	$C_{14}H_{16}N_2O_2$		Etomidato CAS:33125-97-2	2
Metlin	$[M+H]^+$ 245,1285	$C_{14}H_{16}N_2O_2$		3,3- dimetoxibenzidina CAS:119-90-4	2
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 245,1285	$C_{14}H_{13}NO_2$		Koenolina CAS:3909-78-2	2

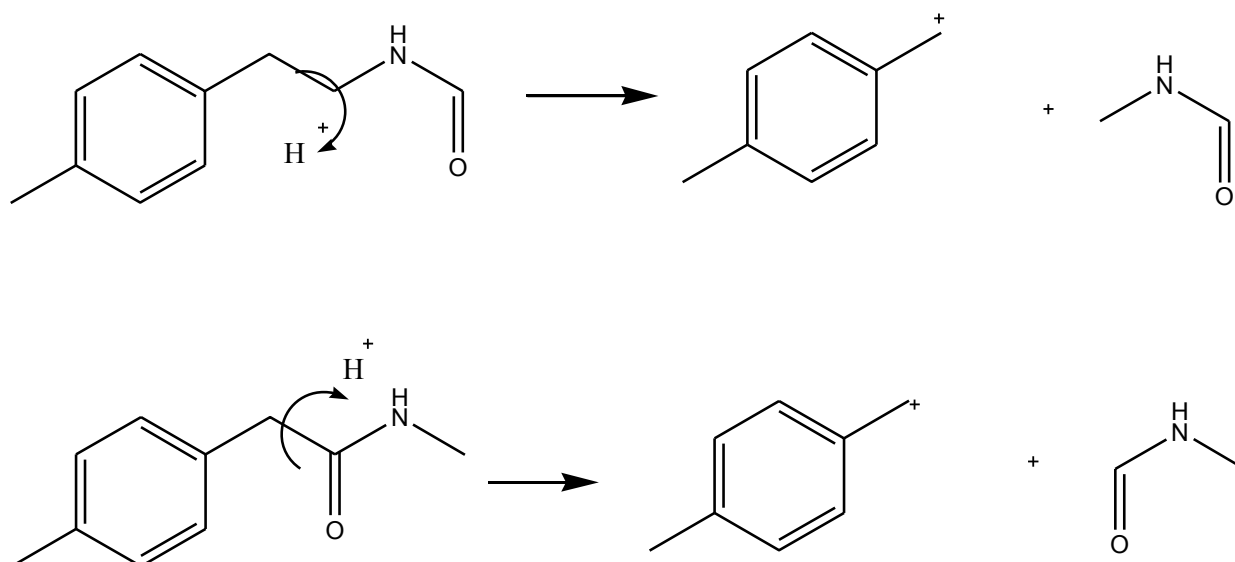
Tabela 09: Continuação.

Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+K]^+$ 245,1302	C ₁₄ H ₂₂ O		Delta-metilionona CAS:79-89-0	4
Metlin	$[M+K]^+$ 245,1302	C ₁₄ H ₂₂ O		Tetradecatrienal	4
Metlin	$[M+K]^+$ 245,1302	C ₁₄ H ₂₂ O		4-Octilfenol	4

O íon molecular $[M+H]^+$ m/z 164,1073 foi detectado nos extratos da bactéria CSP-50a em Nutriente. A literatura sugere alguns compostos, dentre eles: (a) metcatinona (efedrina) encontrado em plantas da família das efedráceas utilizado como estimulante do sistema nervoso central (SAMENUK et al.; 2002); (b) glutamina é um aminoácido não essencial, sintetizado a partir do ácido glutâmico, exerce função na manutenção do sistema imonológico, é um precursor de nitrogênio para a síntese de nucleotideos (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996), (c) formamida.

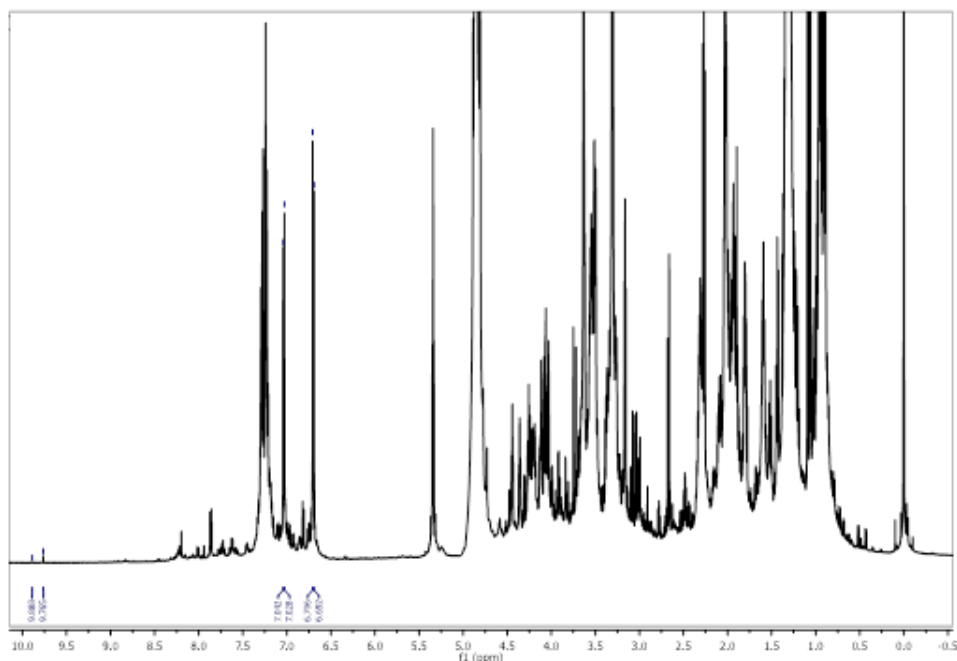
O espectro MS/MS mostra o fragmento m/z 105, que comparado com os compostos sugeridos (Tabela 08), indica as seguintes propostas de metabólitos (Figura 43).

Figura 43: Proposta de fragmentação para os composto de m/z 164.



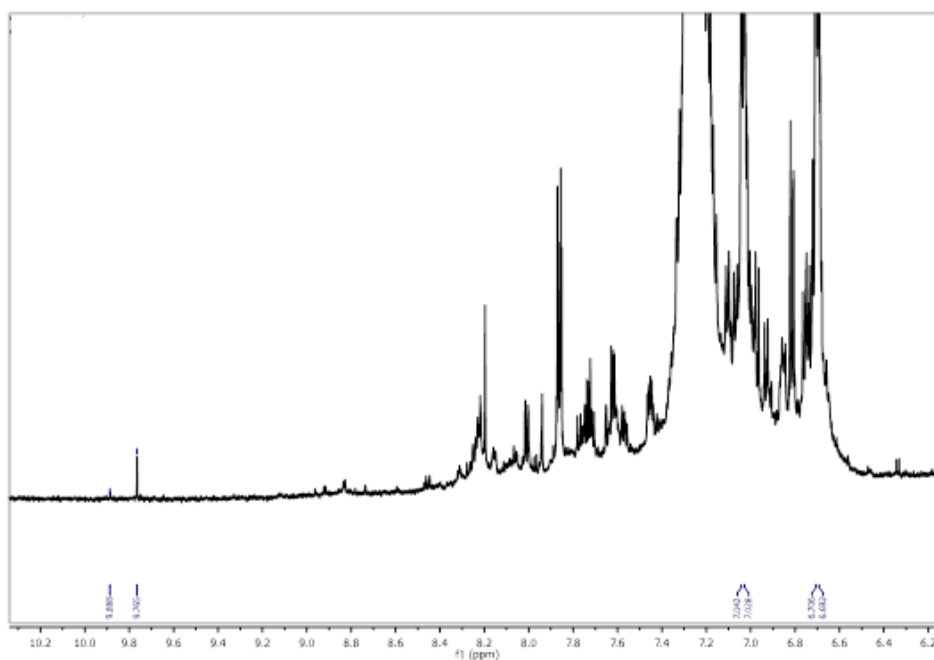
Visando a confirmação desta molécula, foi realizado um experimento de ^1H RMN do extrato analisado. (FIGURA 44).

Figura 44: Espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a em meio nutriente.



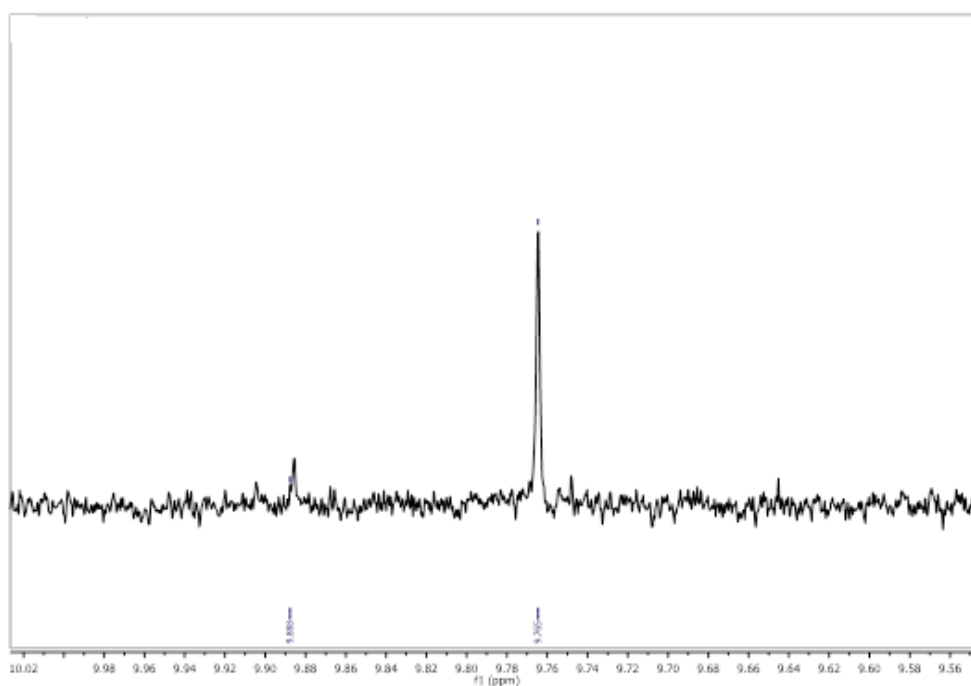
Fica evidente a complexidade do extrato analisado. No entanto, é possível evidenciar regiões onde existe uma alta concentração de hidrogênio pertencentes a açúcares, assim como regiões de hidrogênios pertencentes a cadeias alifáticas. Com relação à proposta molecular discutida através dos dados do experimento MS/MS, é possível confirmar o sistema aromático 1,4 dissubstituído, apresentando dois sinais (dubletos) com uma constante de acoplamento de 8,4 Hz (FIGURA 45).

Figura 45: Ampliação da região aromática do espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a em nutriente.



Também, o aparecimento de sinais em deslocamentos químicos maiores a 9,5 ppm, indicam a presença de hidrogênio de aldeídos na mistura em análise, fato que vem a confirmar a molécula analisada por MS/MS (FIGURA 46).

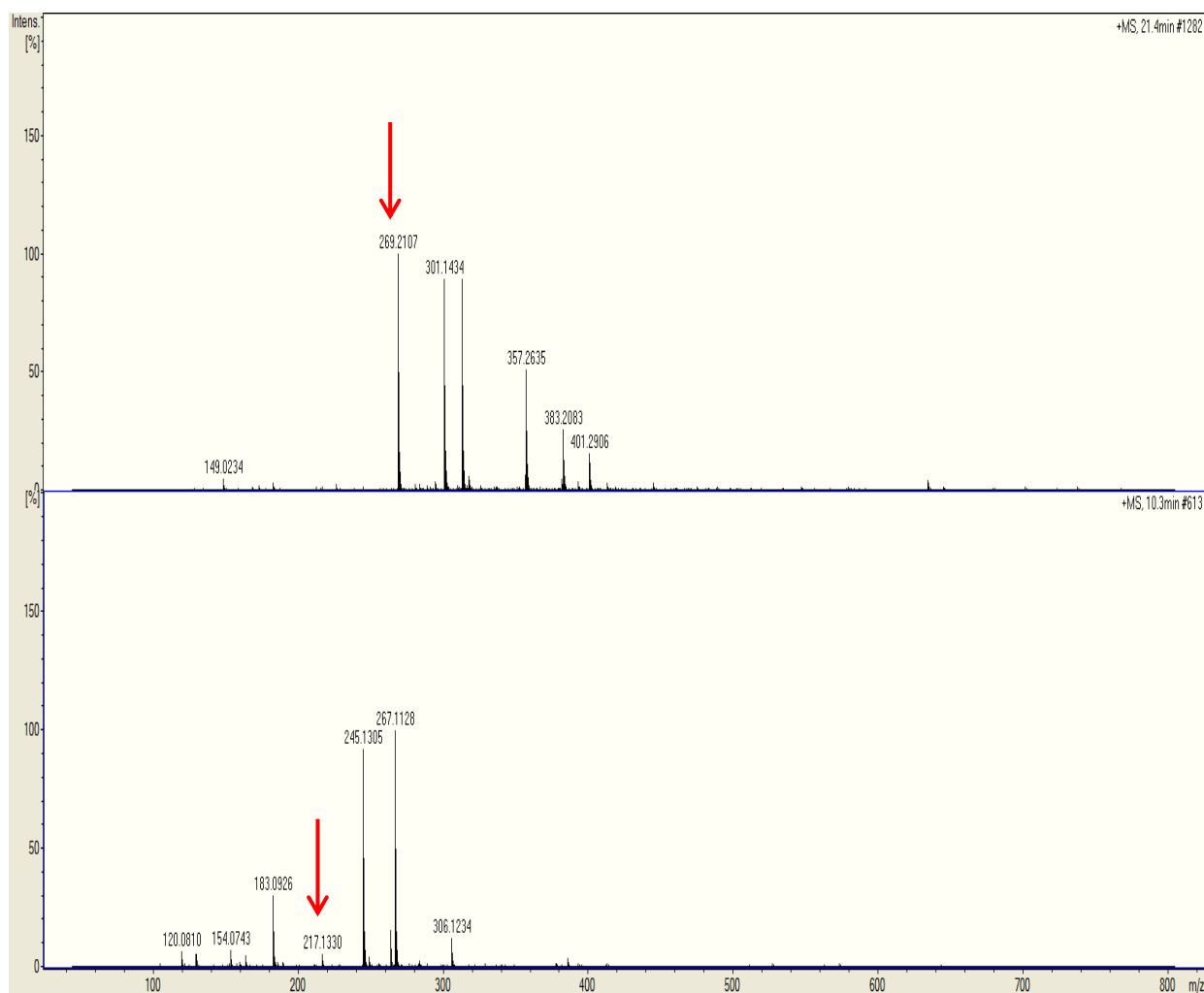
Figura 46: Ampliação da região de hidrogênios desprotegidos do espectro de ^1H RMN (DOCD_3), a 14,1T do extrato CSP-50a.



A aplicação recente do RMN, associada à espectrometria de massas, indica o potencial da técnica para a detecção de moléculas em mistura em extratos de alta complexidade.

Os íons moleculares de m/z 267,0673 e 245,1290 também foram detectados no extrato da linhagem CSP-50a, a literatura sugere alguns compostos para esses íons: (a) ribavirina, indicado no tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C (GREEN, 1928, p. 691); (b) koenolina é um alcaloide de carbazol, foi isolado pela primeira vez da casca da raiz de *Murraya koenigii*, a literatura relata a presença de atividade citotóxica (FIEBIG et al., 1985); (c) tebuthiuron, herbicida muito utilizado no plantio de cana-de-açúcar (NEGRISOLI et al., 2005); (d) etomidato é um derivado de imidazol carboxilado, apresenta propriedades anestésicas e amnésicas (VINSON; BRADBURY, 2002, p. 592). Mas as fragmentações obtidas no espectro de MS/MS não demonstraram relação com os compostos sugeridos pela literatura (Tabelas 07 e 09, podendo ser compostos inéditos, sendo assim, é necessário o isolamento desses compostos para elucidação estrutural.

Figura 47: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-52b em meio nutriente, a) $t_r = 21$ minutos, b) $t_r = 10,3$ minutos.



Os íons de m/z 269,2107 e m/z 217,1330 (Figura 47), foram selecionados devido à ausência no meio de cultura (Branco) e submetidos a análises por MS sequencial e também foi realizado uma busca em bancos de dados disponíveis.

Figura 48: Fragmentação do íon precursor de m/z 269.2107 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

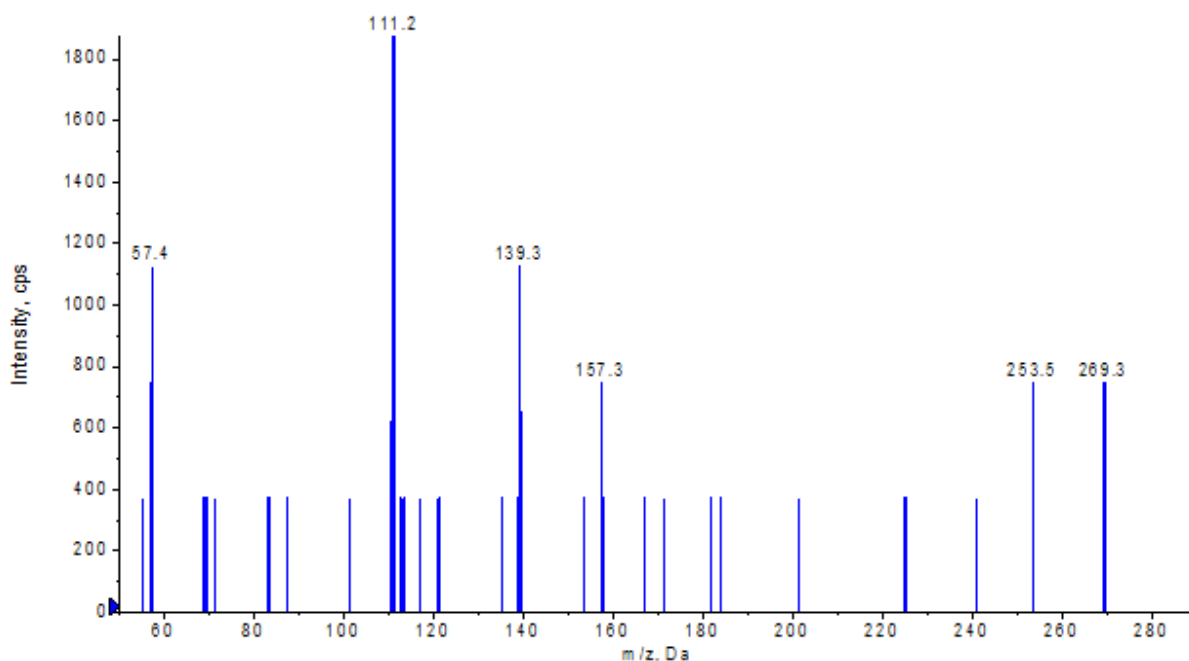


Figura 49: Fragmentação do íon precursor de m/z 217,1330 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

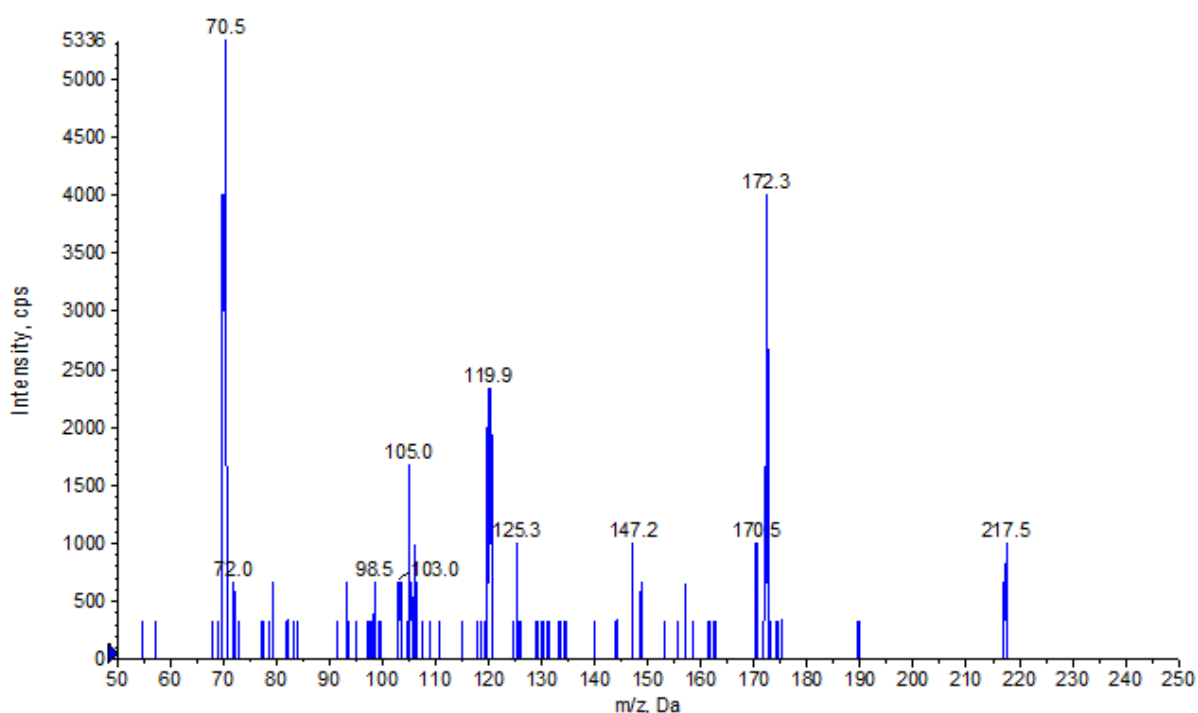
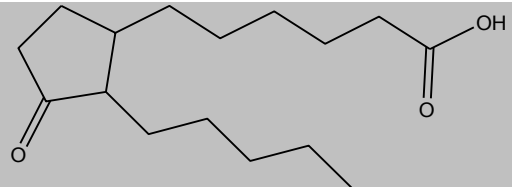
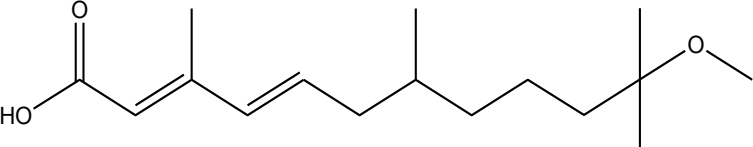
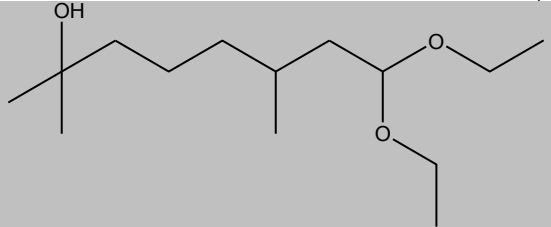


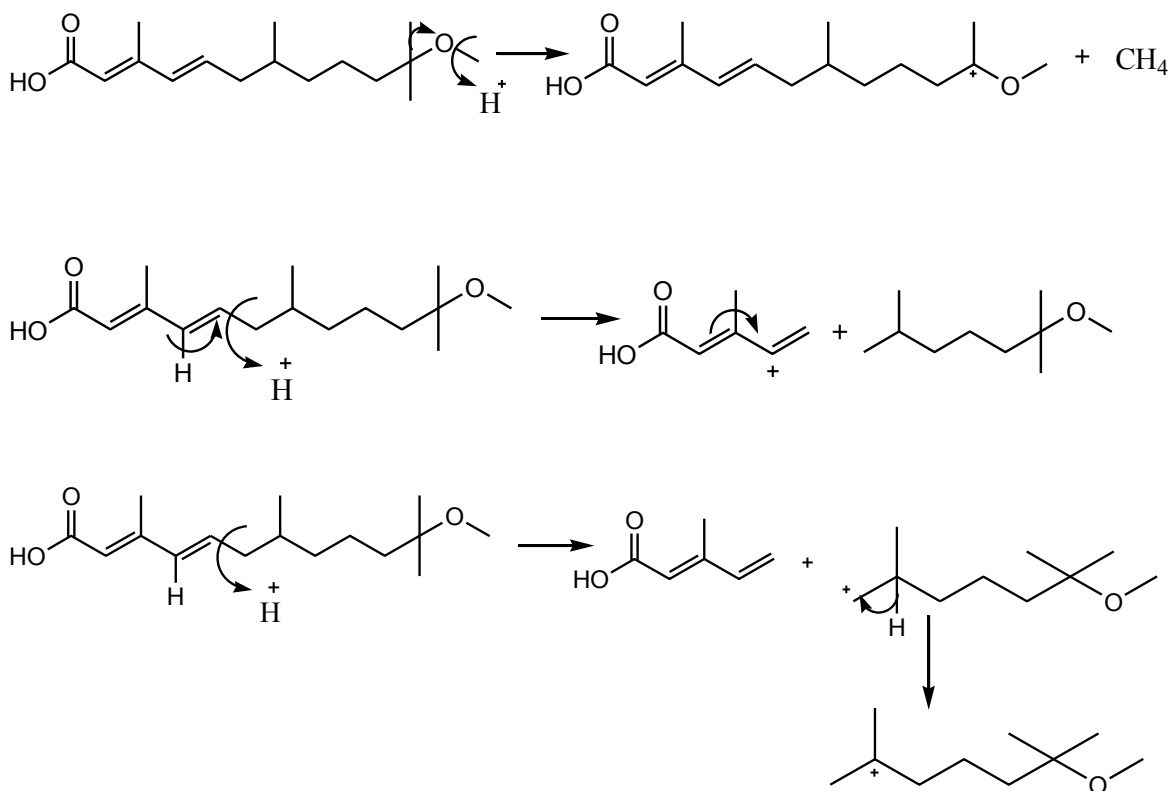
Tabela 10: Resultado da base de dados do íon m/z 269,2107.

Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 269,2111	$C_{16}H_{28}O_3$		-	1
Metlin	$[M+H]^+$ 269,2111	$C_{16}H_{28}O_3$		Ácido Methopreno CAS: 53092-52-7	1
Metlin	$[M+Na]^+$ 269,2087	$C_{14}H_{30}O_3$		CAS: 7779-94-4	7

O íons moleculares de m/z 269,2107 e 217,1330 foram detectados no extrato da bactéria CSP-52b em Nutriente. A literatura sugere alguns compostos: (a) metiltetrahidroharmol, isolado primeiramente da *Peganum harmala* da família das Zygophyllaceae, é encontrado mais frequentemente nas Malpigueáceas, atuam no sistema nervoso central (MANSKE, 1965, p. 47); (b) acetil-metiltriptamina, é encontrado na *Limonia acidissima* (maça madeira), fungos e animais, pertence a família das triptaminas, a sua presença é atribuída como um neurotransmissor (JONES, 1982, p. 117), (c) tetra-hidro-harmina (THH) é um alcalóide indólico fluorescente extraída de *B. caapi*, uma trepadeira lenhosa, é usado na produção de uma bebida psicoativa, ayahuasca, que é ritualmente ingerida para fins medicoreligiosos em toda a América do Sul. Dentre as propostas para o íon de m/z 269, a que mais se assemelha as fragmentações observadas (Figura 48) é o ácido methopreno.

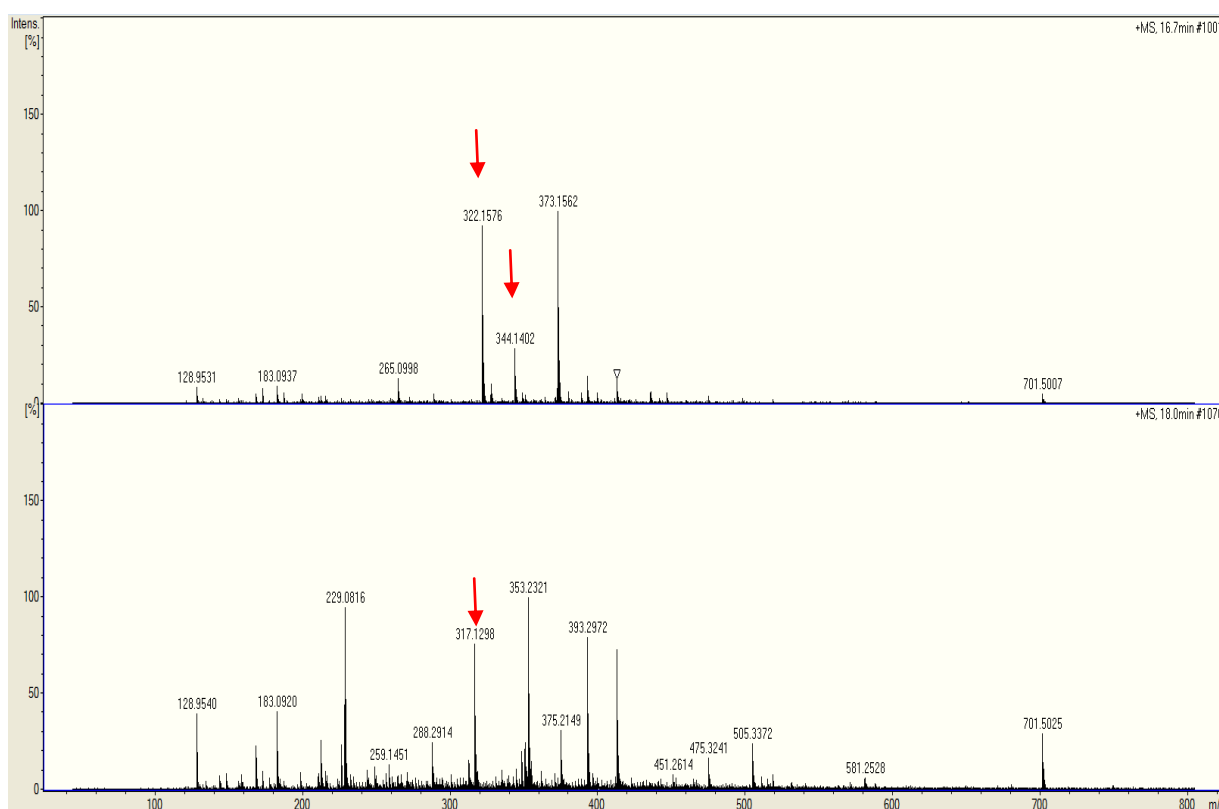
O espectro de MS/MS para o compostos de m/z 269 apresenta as fragmentações de m/z 253, m/z 111 e m/z 157, que são explicados da seguinte forma:

Figura 50: Propostas de fragmentação do composto de m/z 269.



Esse metabólito é conhecido como ácido methopreno, é um hormônio muito utilizado como inseticida, atua inibindo o crescimento dos estados imaturos dos insetos, é muito utilizado na produção de uma série de alimentos (arroz, leite, cereais e amendoim) e animais (WHO, 2008). As fragmentações obtidas no espectro de MS/MS para o composto de m/z 217,1330 não demonstra relação com os compostos sugeridos (Tabela 11), podendo ser um composto inédito, sendo assim, é necessário o isolamento desses compostos para elucidação estrutural.

Figura 51: Espectros de CLAE-ESI-MS do extrato CSP-53b em meio nutritivo, a) $t_r = 16,7$ minutos, b) $t_r = 18$ minutos.



Os íons de m/z 344,1402, m/z 322,1574 e m/z 317,1298 (Figura 51), foram selecionados devido à ausência no meio de cultivo (Branco) e submetidos a análises por MS sequencial e também foi realizada uma busca em bancos de dados disponíveis.

Figura 52: Fragmentação do íon precursor de m/z 344,1402 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

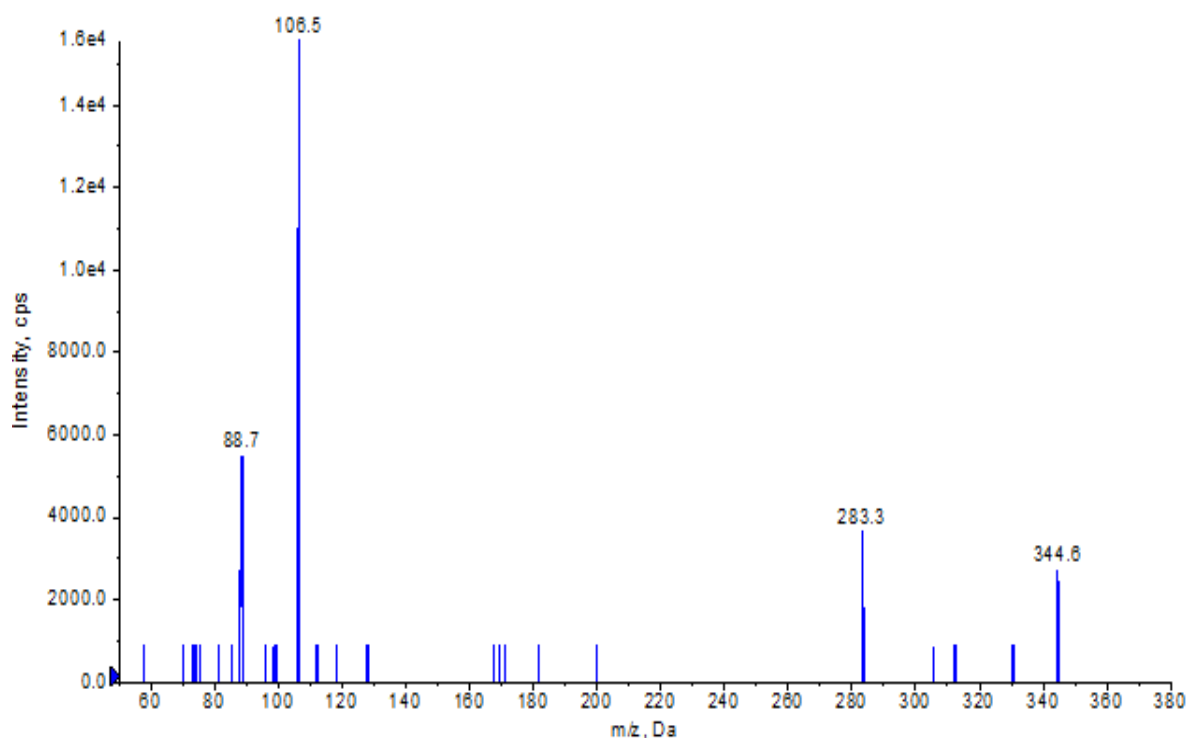


Figura 53: Fragmentação do íon precursor de m/z 322,1574 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

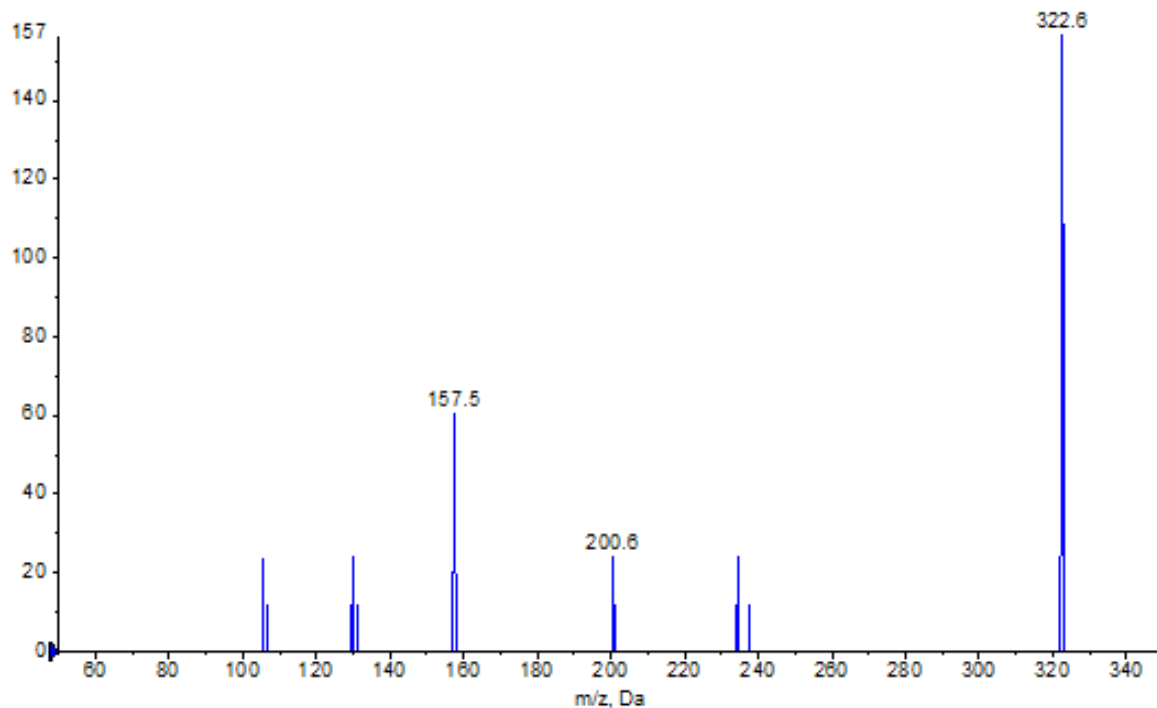


Figura 54: Fragmentação do íon precursor de m/z 317,1298 por ESI-MS. Energia de colisão 25 eV.

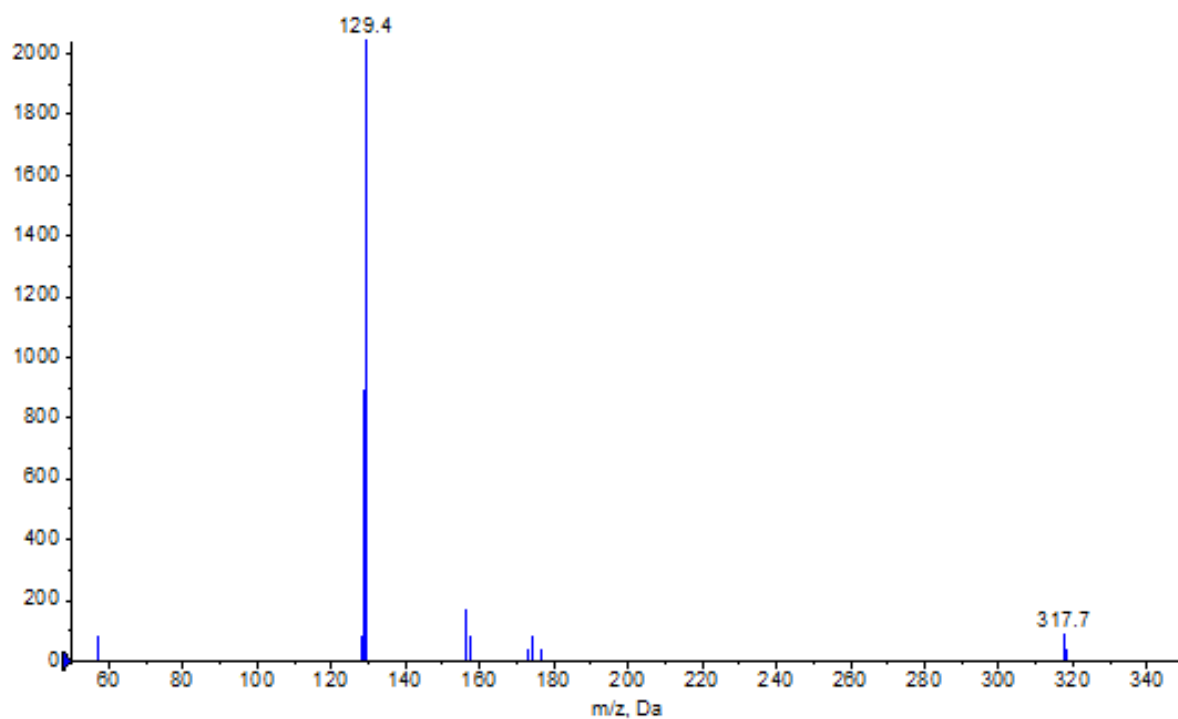


Tabela 12: Resultado da base de dados do íon m/z 344,1402.

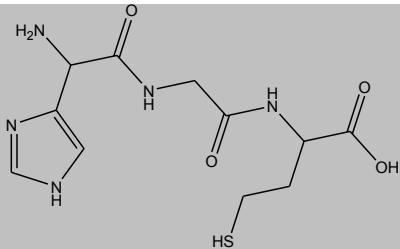
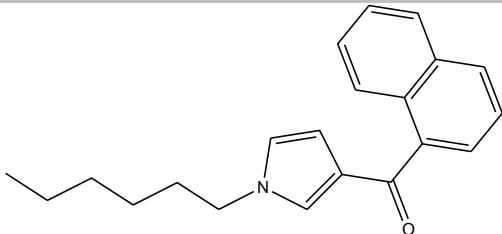
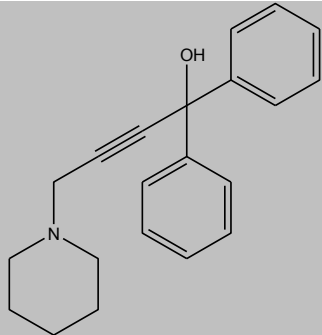
Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 344,1387	$C_{13}H_{21}N_5O_4S$		Peptideo (Hys-Gly-Met)	4
Metlin	$[M+K]^+$ 344,1411	$C_{21}H_{23}NO$		CAS: 162934-74-9	2
Metlin	$[M+K]^+$ 344,1411	$C_{21}H_{23}NO$		CAS: 120501-02-2	2

Tabela 12: Continuação.

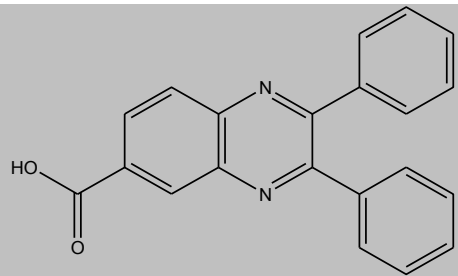
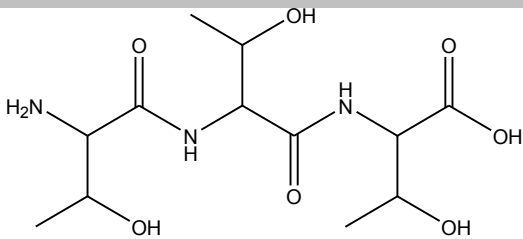
Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 344,1394	$C_{21}H_{14}N_2O_2$		CAS: 32387-96-5	2
Metlin	$[M+Na]^+$ 344,1428	$C_{12}H_{23}N_3O_7$		-	7

Tabela 13: Resultado da base de dados do íon m/z 322,1574.

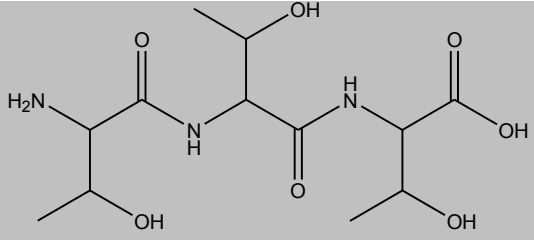
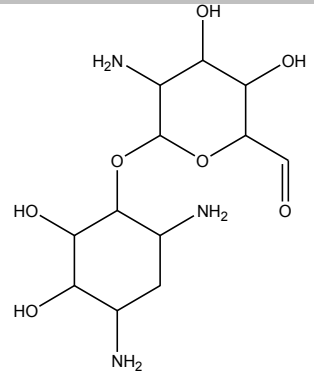
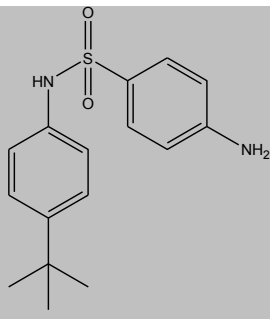
Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+H]^+$ 322,1609	$C_{12}H_{23}N_3O_7$		-	10
Metlin	$[M+H]^+$ 322,1609	$C_{12}H_{23}N_3O_7$		-	10
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 322,1584	$C_{16}H_{20}N_2O_2S$		-	3

Tabela 13: Continuação.

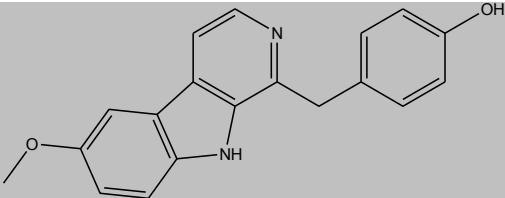
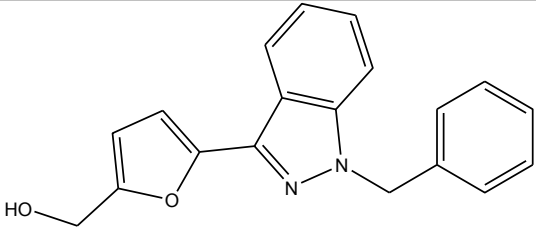
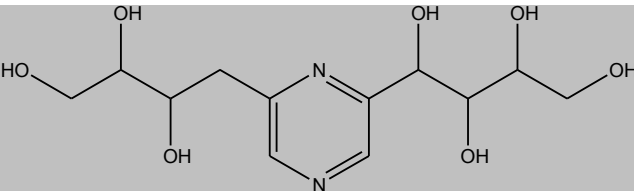
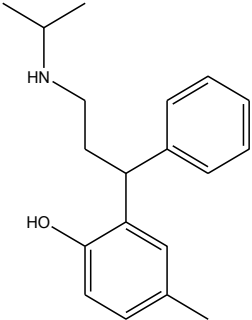
Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 322,1550	$C_{19}H_{16}N_2O_2$		CAS: 76525-09-2	7
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 322,1550	$C_{19}H_{16}N_2O_2$		CAS: 170632-47-0	7
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 322,1609	$C_{12}H_{20}N_2O_7$		CAS: 36806-15-2	10
Metlin	$[M+K]^+$ 322,1568	$C_{19}H_{25}NO$		-	1

Tabela 14: Resultado da base de dados do íon m/z 317,1298.

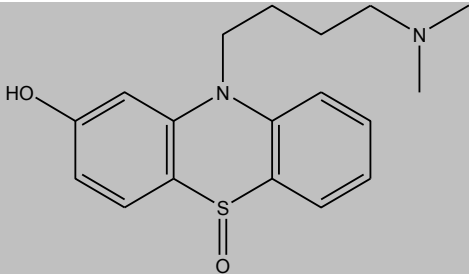
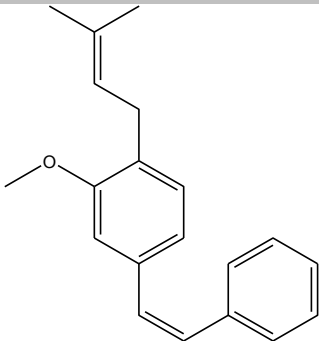
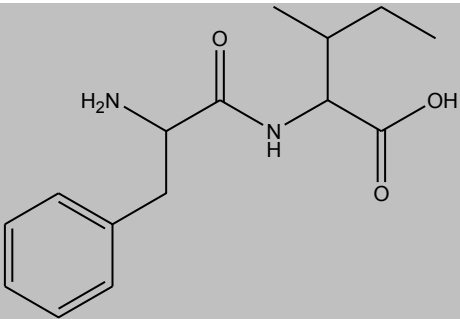
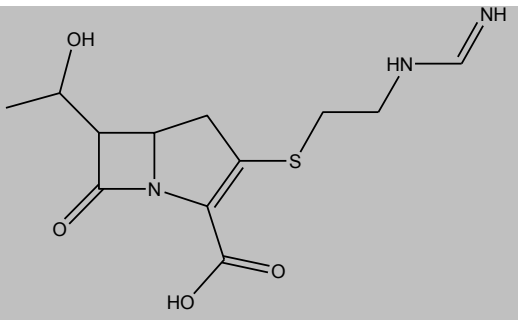
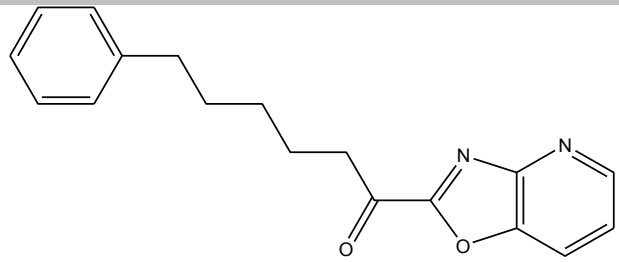
Base de dados	m/z	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin ₂	$[M+H]^+$ 317,1318	$C_{17}H_{20}N_2O_2S$		CAS: 69323-76-8	6
Metlin	$[M+K]^+$ 317,1302	$C_{20}H_{22}O$		CAS: 64125-60-6	1
Metlin	$[M+K]^+$ 317,1262	$C_{15}H_{22}N_2O_3$		CAS:	11

Tabela 14: Continuação.

Base de dados	<i>m/z</i>	Formula molecular	Formula estrutural	Nome ou código	Δ ppm
Metlin	$[M+NH_4]^+$ 317,1278	$C_{12}H_{17}N_3O_4S$		CAS: 64221-86-9	6
Metlin	$[M+Na]^+$ 317,1260	$C_{18}H_{18}N_2O_2$		CAS: 288862-83-9	11

O íons moleculares de m/z 344,1402, 322,1574 e 317,1298 foram detectados no extrato da bactéria CSP-53b em Nutriente. A busca em bancos de dados sugeriu alguns compostos: (a) Peptídeos; (b) Canabinóide sintético; (c) Halocin, bacteriocina encontrada em Archeas halofílicas (LI; XIANG; TAN, 2002); (d) Promazinas, fármacos utilizados no tratamento de esquizofrenia; (e) Imipenem, antimicrobiano de amplo espectro, da família dos carbapenêmicos (CLISSOD; TODD; CAMPOLI-RICHARDS, 1987). Porém, as fragmentações obtidas no espectro de MS/MS para os três compostos (m/z 344,1402, m/z 322,1574 e m/z 317,1298) não demonstraram relação com os compostos sugeridos (Tabelas 12, 13 e 14), podendo ser compostos inéditos, por tanto, faz necessário o isolamento desses compostos para elucidação estrutural.

CONCLUSÃO

Conclusão

Apesar da dificuldade, perante a complexidade presente na rizosfera, ela mostrou-se um ambiente de extrema atividade e interação microbiana, sendo uma promissora fonte de produção de metabólitos. Fatores intrínsecos e extrínsecos foram fundamentais para a compreensão da composição microbiana que se desenvolve na rizosfera das plântulas de *Senna spectabilis* e, como esses fatores alteram essa microflora. Tal o caso evidenciado na mudança de temperatura na cada de vegetação o que acarretou na alteração da população microbiana da rizosfera. Esse sistema dinâmico é importante para o desenvolvimento desses micro-organismos, que estão interagindo diretamente entre si, como foi possível observar naqueles que não conseguiram se desenvolver isoladamente, sugerindo simbioses ou sinergismos ainda a serem estudados.

O monitoramento do crescimento das linhagens foi crucial para o conhecimento de como esses micro-organismos se desenvolvem isoladamente relacionando, essa observação, com a produção metabólica, onde nas fases de maior crescimento, ocorre a produção de metabólitos primários e, na de menor crescimento, ocorre a produção de metabólitos secundários.

O perfil químico evidenciou que as bactérias produzem compostos diferentes de acordo com os nutrientes presentes no meio, e em um período de escassez nutricional esta é forçada a alterar sua via metabólica, ocasionando também a mudança na produção de compostos.

A baixa quantidade de substâncias produzidas nas condições de cultivo testadas em meio líquido demonstrou ser um desafio para o isolamento dessas substâncias, assim, tentou-se a detecção e identificação desses compostos em mistura, aliando a sensibilidade da espectrometria de massas com bancos de dados de produtos naturais e artigos científicos disponíveis, ressaltando a importância da criação de bancos de dados robustos e específicos para micro-organismo.

A abordagem utilizada nesse trabalho gerou informações importantes sobre a relação desses micro-organismos e a rizosfera, destacando a importância e a complexidade desse rico ambiente. Esses resultados servirão

como base para trabalhos futuros buscando o esclarecimento e a exploração racional das relações microbianas e, suas trocas metabólicas oriundas da microflora com a planta.

Referências

- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 824-827, 2005.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A. J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ANEJA, K. R. **Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology**. 4th ed. New Delhi: New Age International, 2003. 632 p.
- AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMUCKH, S. K. **Fungi: multifacetated microbes**. New Dehli: Anamaya, 2011. p. 189-207.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. **Bioteecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2002. p. 269-294.
- BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNÓZ, V.; QUENEVA, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. J. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidiciplinar approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition testpertinent for the detection of antimalarial natural products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 271-275, 2000.
- BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 343-351, 2002.
- BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. N. Optical methods for laboratory diagnosis of infectious diseases. **Bailey and Scott's diagnostic microbiology**. 9th ed. Sant Louis: Mosby. 1994. p. 65-83.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Bacteria – plant growth-promoting. In: HILLEL, D. (Ed.). **Encyclopedia of soils in the environment**. Amsterdan: Academic Press, 2005. v. 1, p. 103-115.
- BEDNAREK, P.; OSBOURN, A. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. **Science**, v. 324, p. 746-748, 2009.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BESSERER, A.; PUECH-PAGES, V.; KIEFER, P.; GOMES-ROLDAN, V.; JAUNEAU, A.; PORTAIS, J. C.; BICARD, G.; SÉJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulates Arbuscular mycorrhizal fungi by activation mitochondria. **PLoS Biology**, v. 4, n. 7, p. 1239-1247, 2006.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, p. 5929-5934, 1995.

BORGES, C. N.; BRUNS, R. E.; ALMEIDA, A. A.; SCARMINIO, I. S. Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. **Analítica Chimica Acta**, v. 595, p. 28-37, 2007.

BOTTONE, E. J. The gram stain: the century-old quintessential rapid diagnostic test. **Laboratory Medicine**, v. 19, p. 288-291, 1988.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

CARNEIRO, E. **A conquista da Amazônia**. [Rio de Janeiro]: Ministério da Viação e Obras Públicas, 1956. (Coleção Mauá).

CARRER FILHO, R. **Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotoras de crescimento do tomateiro**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, 2002.

CLISSOLD, S. P.; TODD, P. A.; CAMPOLI, R. D. M. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 33, n. 3, p. 183-241, 1987.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 302-307, 1997.

CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; CONSTANT, H. L.; FANG, L.; SEO, E. K.; LONG, L.; CUI, B. L.; BARRILOS, K. S. The desreplication of natural products. **Studies in Natural Products Chemistry**. v. 19, p. 749-791, 1996.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. de A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei* **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, p. 1144-1152, 1997.

ENSIFN, J. C. Formation, properties and germination of actinomycete spores. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 185-219, 1978.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAW, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 321, p. 279-303, 2009.

- FIEBIG, M.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGORN, A. D. Koenoline, a further cytotoxic carbazole alkaloid from *Murraya koenigii*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 3041-3043, 1985.
- FIEHN, O.; KRISTAL, B.; OMMEN, B. V.; SUMNER, L. W.; SANSONE, S. A.; TAYLOR, C.; HARDY, N.; KADDURAH-DAOUK, R. Establishing reporting standards for metabolomics and metabonomics studies: a call for participation. **OMICS: Journal of Integrative Biology**, v. 10, p. 158-163, 2006.
- FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1127-1135, 1992.
- FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; REDESTIG, H.; ARITA, M.; SAITO, K. Integrated omics approaches in plant systems biology. **Chemical Biology**, v. 13, p. 532-538, 2009.
- GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOS SEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Journal of Plant Diseases and Protecion**, v. 108, p. 530-535, 2001.
- GREEN, H. N. Vitamin A as an anti-infective agent. **The British Medical Journal**, v. 2, p. 691-696, 1928.
- GREVE, H.; MOHAMED, I. E.; PONTIUS, A.; KEHRAUS, S.; GROSS, H.; KONIG, G. M. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 537-545, 2010.
- GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIJ-ZIMENEZ, C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiology Methods**, v. 36, p. 115-122, 1999.
- GUILHERMINO, L.; SOBRAL, O.; CHASTINET, C.; RIBEIRO, R.; GONÇALVES, F.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M. A. *Daphnia magna* first brood chronic test: an alternative to the 21-day chronic bioassay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, p. 67-74, 1999.
- GUO, B.; DAI, J.-R.; NG, S.; HUAND, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTÉ, B. K. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of RCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 602-604, 2000.
- HOOD, L.; ROWEN, L.; GALAS, D. J.; AITCHISON, J. D. Systems biology at the institute for systems biology. **Briefings Functional Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 239-248, 2008.
- JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. **Planta Medica**, v. 71, n. 9, p. 795-802, 2005.

JELLER, H.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabilis*). **Revista Ciência Florestal**, v. 11, n. 1, p. 93-104, 2001.

JONES, R. S. Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 19, p. 117-139, 1982.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR based metabolomic analysis of plant. **Nature Protocols**, v. 5, p. 536-549, 2010.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWICZ, R. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Academic Publishers, 1990. p. 315-326.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA: GTZ, 2004. 288 p.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. Microbial genetic resources and biodiscovery. In: KURTBOKE, I.; SWINGS, J. (Ed.). **Microbial genetic resources and biodiscovery**. Queensland: WFCC, 2004. p. 163-184.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298-300, 2000.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VANDERSAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LEE, I. K.; SHAMON, L. A.; CHAI, H-B.; CHAGWEDERA, T. E.; BESTERMAN, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cell-cycle specific cytotoxicity mediated by rearranged *ent*-kaurene diterpenoids isolated from *Parinari curatellifolia*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 99, p. 193-204, 1996.

LI, P.; QI, L. W.; LIU, E. H.; ZHOU, J. L.; WEN, X-D. Analysis of chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 66-77, 2008.

LI, W. H. J.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LI, Y.; XIANG, H.; TAN, H. Halocin: protein antibiotics produced by extremely halophilic archaea. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 42, n. 4, p. 502-505, 2002.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. **The handbook of metabonomics and metabolomics: methods and protocols**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

LINES-KELLY, R. The rhizosphere: soil biology basics. **Profitable and sustainable primary industries**. 2005. Disponível em:

<http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf>.

Acesso em: 23 out. 2013.

MANSKE, R. H. F. The carboline alkaloids. **The alkaloids**. New York: Academic Press, 1965. v. 8, p. 47-53.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. San Francisco: Brock, 2003.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.

McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in environment. **A Review Gene**, v. 115, p. 189-192, 1990.

MELLO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, 1998. p. 88-112.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 321-329, 2010.

MOREIRA, M. S. A.; VIEGAS JUNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795-799, 2003.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEGRISOLI, E.; COSTA, E. A. D.; VELINI, E. D.; CAVENAGHI, A. L.; TOFOLI, G. R. Deposition and leaching of tebutiuron on sugar cane straw applied with and without alkyl polyglycoside adjuvant. **Journal Environmental Science and Health**, v. 40, p. 207-214, 2005.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W. T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, p. 1054-1056, 2008.

OLSENG, J.; LANE, E. J.; GIOVANNONSI, J.; PACE, N. R.; STAHL, A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 331-355, 1986.

ONDEYKA, J. G.; HELMAS, G. L.; HENSENS, O. D.; GOETZ, M. A.; ZINK, D. L.; TSIPOURAS, A.; SHOOP, W. L.; SLAYTON, L.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISHOOK, J. D.; OSTLIND, D. A.; TSOU, N. N.; BALL, R. G.; SINGH, S. B. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 8809-8816, 1997.

PACE, N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 27, p. 734-740, 2002.

PEI, A.; NOSSA, C. W.; CHOKS, P.; BLASER, M. J.; YANG, L.; ROSMARIN, D. M.; PEI, Z. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. 1-9, 2009.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

PIVATTO, M. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil de *S. spectabilis* e *Cássia leptophylla***. 2005. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-20, 2001.

REIS JÚNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3417-3418, 1992.

ROCHFORD, S. Metabolomics reviewed: a new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813-1820, 2005.

RODRIGUES, R. S.; FLORES, A. S.; MIOTTO, T. S.; BAPTISTA, L. R. M. O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2005.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I. S. (Ed.). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: Ed. USP, 2002. p. 97-129.

ROWBOTTOM, G. D.; KEAST, D.; MORTON, R. A. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v. 21, p. 80-97, 1996.

ROY, M. P.; PODDAR, M.; SINGH, K. K.; GHOSH, S. Purification, characterization and properties of phytase from *Shigella* sp. CD2. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, p. 266-271, 2012.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001. v. 1.

SAMENUK, D.; LINK, M. S.; HOMOUD, M. K.; CONTRERAS, R.; THEOHARDES, T. C.; WANG, P. J.; MARK ESTES, N. A. Adverse cardiovascular events temporally associated with Ma Huang, an herbal source of ephedrine. **Mayo Clin Proceedings**, v. 77, p. 12-16, 2002.

SCHRIJVER, A.; MOT, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, p. 85-119, 1999.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 191-196, 1999.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; MOHANA, K. P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

SHYUR, L. F.; YANG, N. S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 66-71, 2008.
SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semi-sintéticos como potenciais candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38-46, 2010.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. Associados com espécies vegetais de Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SOUZA, C. R. G.; LUNA, G. C. Unidades quaternárias e vegetação nativa de planície costeira e baixa encosta no litoral norte de São Paulo. **Revista do Instituto Geológico**, v. 29, p. 1-18, 2008.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VAN-LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and system biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive peperidini alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908-910, 2004.

VINSON D. R.; BRADBURY, D. R. Etomidate for procedural sedation in emergency medicine. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, n. 6, p. 592-598, 2002.

WANG, L.; XU, B.; SU, Z.; LIN, F.; ZHANG, C.; KUBICEK, C. P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methoprene in drinking-water**: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Geneva, 2008.

YATEEM, A.; AL-SARRAH, T.; BIN-HAJI, A. Investigation of microbes in the rhizosphere of selected grasses for rhizoremediation of hydrocarbon-contaminated soils. **Soil and Sediment Contamination**, v. 16, p. 269-280, 2007.

ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOWSKI, D.; LI, Z.; ZHANG, Y.; ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M. T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V.; SMITH, R. G.; MOLLER, D. E. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, p. 974-977, 1999.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1266-1271, 2007.