

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Natália Priscila Silva de Oliveira**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES DE INTERESSE INDUSTRIAL E  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS FRUTOS DA  
MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart)**

**Belo Horizonte**

**2012**

**Natália Priscila Silva de Oliveira**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES DE INTERESSE INDUSTRIAL E  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS FRUTOS DA  
MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart)**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

**Orientadora: Dra. Vera Lúcia dos Santos**

**Co-orientadora: Dra. Fernanda Fraga Campos**

**Belo Horizonte**

**2012**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as conquistas em minha vida;

À minha família, pelo apoio e carinho;

À amiga Priscila Cordeiro, que permitiu que eu pudesse estar hoje no Laboratório de Microbiologia Aplicada. Sua indicação tem um significado muito grande para mim, aprendi e continuo aprendendo muitas coisas na UFMG, mas tudo isso começou graças a sua iniciativa e boa vontade;

À Prof. Dr. Vera Lúcia dos Santos, pela orientação e oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada;

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, pela agradável convivência de todos os dias;

À mestranda Aline Júlio pela atenção e disponibilidade em todos os momentos que precisei;

Ao amigo Spencer, pelos momentos divertidos compartilhados no laboratório e nas aulas da especialização.

Aos amigos Vitor e Gabriela que tanto me ajudaram na elaboração desta monografia;

À amiga Suzi Pacheco, pela companhia no início desta caminhada, e por todos os momentos bons que compartilhamos no laboratório;

À aluna de iniciação científica Andressa Lafaete, pela ajuda em meus experimentos, boa vontade, e pela torcida pra que tudo dê certo;

À Professora Dr. Regina Nardi e Dr. Mariana Vieira, por terem aceitado o convite em participar da banca. Sem dúvida, suas sugestões serão muito importantes para a melhoria deste trabalho;

À doutoranda Irany Mesquita, pela disponibilidade em participar como suplente da banca avaliadora;

À equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais, pela colaboração nos trabalhos realizados;

Agradeço especialmente a Dr. Fernanda Fraga Campos, por estar ao meu lado em cada etapa deste trabalho, desempenhando um papel muito além de co-orientadora, contribuindo de forma significativa para o meu crescimento pessoal e profissional, e a quem desejo todo o sucesso do mundo!!!

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	vii
Lista de tabelas .....	viii
Lista de siglas e abreviaturas .....	ix
Resumo .....	11
Abstract.....	13
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 Macaúba ( <i>Acrocomia aculeata</i> ) .....	17
2.2 Macaúba e biodiesel .....	18
2.3 Micro-organismos associados à planta .....	20
2.4 Síntese de exoenzimas por bactérias .....	23
2.4.1 Amilases .....	22
2.4.2 Lipases .....	24
2.4.3 Celulases .....	25
2.4.4 Xilanases.....	26
2.4.5 Proteases .....	27
2.4.6 Pectinases .....	28
2.5 Bactérias e produtos bioativos .....	29
3 OBJETIVOS .....	31
3.1 Objetivo geral .....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Área de coleta e amostragem.....	32
4.2 Isolamento e preservação de bactérias associadas aos frutos da macaúba.....	33
4.2.1 Isolamento e preservação de bactérias epifíticas associadas aos frutos da macaúba .....	33
4.2.2 Isolados e preservação de bactérias endofíticas da casca dos frutos da macaúba .....	34
4.2.3 Isolamento e preservação de bactérias associadas à polpa dos frutos da macaúba .....	35
4.3 Identificação das bactérias .....	35
4.3.1 Extração do DNA total .....	35
4.3.2 PCR com iniciadores 8F e 907R para amplificação da região 16S do rDNA .....	36

4.3.3	Purificação dos amplicons usando EDTA .....	36
4.3.4	Reação de sequenciamento .....	36
4.3.5	Precipitação da reação de sequenciamento .....	37
4.3.6	Análise computacional das sequências .....	37
4.4	Caracterização do potencial de produção de exoenzimas por bactérias .....	37
4.4.1	Amilases .....	38
4.4.2	Lipases .....	38
4.4.3	Celulases .....	38
4.4.4	Xilanases .....	38
4.4.5	Proteases .....	39
4.4.6	Pectinases .....	39
4.5	Determinação da atividade antimicrobiana .....	39
4.5.1	Método por difusão em agar .....	40
4.5.1.1	Bactérias e leveduras reveladoras .....	40
4.5.1.2	Fungos filamentosos .....	40
4.5.2	Cultivo das bactérias e preparo dos extratos brutos .....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1	Isolamento das bactérias .....	41
5.2	Identificação das bactérias baseada em métodos moleculares .....	46
5.3	Atividades enzimáticas .....	48
5.3.1	Amilases .....	48
5.3.2	Lipases .....	50
5.3.3	Celulases .....	51
5.3.4	Xilanases .....	53
5.3.5	Proteases .....	54
5.3.6	Pectinases .....	56
5.4	Atividade antimicrobiana .....	59
5	CONCLUSÃO .....	65
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Características morfológicas da palmeira macaúba.....	18
<b>FIGURA 2</b>	Comparação da capacidade produtiva de óleo vegetal por algumas espécies oleaginosas.....	20
<b>FIGURA 3</b>	Estrutura química da amilose e amilopectina .....	24
<b>FIGURA 4</b>	Estrutura química da celulose .....	26
<b>FIGURA 5</b>	Estrutura química da xilana e pontos de clivagem das endoxilanases e xilosidases .....	27
<b>FIGURA 6</b>	Estrutura química da pectina.....	29
<b>FIGURA 7</b>	Localização dos indivíduos de <i>Acrocomia aculeata</i> , presentes em Casa Branca, amostrados neste estudo .....	32
<b>FIGURA 8</b>	Armazenamento dos frutos da macaúba sob a palmeira.....	33
<b>FIGURA 9</b>	Bactérias isoladas de diferentes partes dos frutos da macaúba.....	42
<b>FIGURA 10</b>	Isolados que apresentaram produção de amilase .....	50
<b>FIGURA 11</b>	Isolado que apresentou atividade de celulase .....	53
<b>FIGURA 12</b>	Isolados que apresentaram produção de protease .....	56
<b>FIGURA 13</b>	Isolados que apresentaram produção de pectinase.....	58
<b>FIGURA 14</b>	Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba contra bactérias de interesse médico.....	63
<b>FIGURA 15</b>	Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba contra espécies de <i>Candida</i> .....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Descrição das bactérias associadas aos frutos da macaúba, com relação à parte dos frutos de que foram isoladas, reação tintorial de Gram e características macro e micro morfológicas.....	43
<b>TABELA 2</b>	Identificação das bactérias isoladas dos frutos da macaúba por meio do sequenciamento da região 16S rDNA.....	47
<b>TABELA 3</b>	Atividade de amilase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo .....	49
<b>TABELA 4</b>	Atividade de lipase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo. ....	51
<b>TABELA 5</b>	Atividade de celulase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo. ....	52
<b>TABELA 6</b>	Atividade de protease, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo. ....	55
<b>TABELA 7</b>	Atividade de pectinase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo. ....	57
<b>TABELA 8</b>	Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba ( <i>A. aculeata</i> ), contra bactérias, leveduras e fungos de importância médica e um fitopatógeno.. ....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- **ATCC** – American Type Culture Collection
- **BDA** – Ágar Dextrose Batata
- **BHI** – Brain Heart Infusion
- **BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool
- **CMC** - Carboximetilcelulose
- **cm** - Centímetro
- **cm<sup>2</sup>** – Centímetro quadrado
- **D.C** – Diâmetro da colônia
- **D.H** – Diâmetro do halo
- **D.O** – Densidade óptica
- **DMSO** - Dimetilsulfóxido
- **DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- **dNTP** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- **EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **FeSO<sub>4</sub>** – Sulfato ferroso
- **g** - grama
- **h** - Hora
- **ha** - Hectare
- **I.E** – Índice enzimático
- **KCL** – Cloreto de potássio
- **Kg** - Kilograma
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Dihidrogenofosfato de potássio
- **L** - Litro
- **m** - Metro
- **M** - Molar
- **mg** - miligrama
- **MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de magnésio
- **MgSO<sub>4</sub>** – Sulfato de magnésio
- **min** - minuto
- **mL** - Mililitro
- **mM** - Milimolar

- **mm** - milímetro
- **μg** - micrograma
- **μL** - microlitro
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – dihidrogenofosfato de sódio
- **NaCl** – Cloreto de sódio
- **NaNO<sub>3</sub>** – Nitrato de sódio
- **ng** - nanograma
- **nm** - nanômetro
- **PCR** – Reação em cadeia de polimerase
- **pH** – Potencial hidrogeniônico
- **r.p.m** – Rotações por minuto
- **rDNA** – DNA ribossomal
- **T<sub>0</sub>** - Tempo 0
- **TSA** – Trypic Soy Agar
- **UFC** – Unidade formadora de colônia
- **ZnSO<sub>4</sub>** – Sulfato de zinco
- **°C** – graus Celsius
- **%** - por cento

## RESUMO

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira arborescente, pertencente à família *Arecaceae*, distribuída amplamente por toda América tropical. A espécie chama a atenção pela propriedade oleaginosa dos frutos com potencial para produção de biodiesel. No entanto, o conhecimento a respeito do cultivo e manejo visando selecionar frutos de boa qualidade para a extração do óleo ainda é escasso. Associado a isso, não existem dados na literatura a respeito da microbiota associada aos frutos, sendo este um fator de grande importância na qualidade do óleo. Sabe-se que os micro-organismos associados à plantas podem produzir uma diversidade de exoenzimas que poderão influenciar na qualidade do fruto e conseqüentemente do óleo. Além do grande potencial do uso desta espécie para a produção de biodiesel, inúmeras utilidades para a medicina popular já foram relatadas, sendo utilizada como fortificante, analgésico, febrífugo e diurético. Diante da grande importância dessa espécie vegetal, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias associadas aos frutos da macaúba com diferentes períodos de deposição no solo, e ainda, avaliar os isolados obtidos quanto à capacidade de produzir exoenzimas de interesse industrial e substâncias bioativas contra bactérias, leveduras, fungos de interesse clínico e um fitopatógeno. Para realização deste trabalho, 6 coletas foram realizadas em Casa Branca – município de Brumadinho, Minas Gerais. Na primeira coleta, os frutos foram coletados ainda no cacho, e nas coletas subsequentes os frutos foram recolhidos a cada 7 dias de deposição no solo, até o período máximo de 35 dias. O epicarpo e o mesocarpo dos frutos foram processados de forma a isolar bactérias epifíticas, endofíticas da casca e associadas à polpa. Foram obtidos 94 isolados de bactérias, selecionados de acordo com as suas características macro morfológicas e identificados por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA. Das 94 bactérias, 43,62% apresentaram produção de amilase, 9,57% de lipase, 27,66% de celulase, 31,91% de protease, 53,19% de pectinase e nenhuma das bactérias produziu xilanases. Dos 94 isolados testados quanto à produção de substâncias bioativas, 22% apresentaram atividade antagonista contra *Bacillus cereus*, 14,9% contra *Staphylococcus aureus*, 12,8% contra *Escherichia coli*, 7,5% contra *Candida albicans*, 9,5% contra *C. krusei* e 8,5% contra *C. tropicalis*. Nenhum isolado apresentou atividade para *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium oxalicum*. O presente trabalho contribuiu para o conhecimento de bactérias produtoras de exoenzimas demonstrando o

potencial desses isolados para aplicação industrial. Além disso, a produção de substâncias bioativas pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas drogas.

**Palavras-chave:** *Acrocomia aculeata*, macaúba, bactérias, exoenzimas, antagonismo.

## ABSTRACT

The macaw (*Acrocomia aculeata*) is an arborescent palm, belonging to the family *Arecaceae*, widely distributed throughout tropical America. The species calls attention to the property of oleaginous fruits with potential for biodiesel production. However, knowledge about the cultivation and management in order to select quality fruits for oil extraction is still scarce. In association with this fact, there are no data in the literature about the microbiota associated with fruit, it is a major factor in the quality of the oil. It is known that micro-organisms in plants can produce a variety of exoenzymes that may influence the quality of the fruit and thus the oil. Besides the great potential of using this species for the production of biodiesel, countless uses for folk medicine have been reported, being used as a tonic, analgesic, diuretic and febrifuge. Given the great importance of this plant species, this study aimed to isolate and identify bacteria associated with macaw fruits with different periods of deposition on soil, and also to evaluate these isolates for their ability to produce exoenzymes of industrial interest, and bioactive substances against bacteria, yeasts, and fungi of clinical interest and a phytopathogen. For this study, six collections were made in Casa Branca - Brumadinho municipality, Minas Gerais. In the first collection, the fruits were collected in the bunch, and in the subsequent collections, the fruits were collected in every 7 days of deposition on soil, until the maximum of 35 days of deposition. The fruit epicarp and mesocarp were processed to isolated epiphytic, peel endophytic, and pulp associated bacteria. We obtained 94 isolates of bacteria, selected according to their macro morphological characteristics and identified through sequencing of 16S rDNA. Of the 94 bacteria, 43.62% showed amylase production, 9.57% lipase, 27.66% cellulase, 31.91% protease, 53.19% pectinase and no bacteria produced xylanases. Of the 94 isolates tested for bioactive substances production, 22% had antagonistic activity against *Bacillus cereus*, 14.9% against *Staphylococcus aureus*, 12.8% against *Escherichia coli*, 7.5% against *Candida albicans*, 9.5% against *C. krusei* and 8.5% against *C. tropicalis*. None of the isolates showed activity for *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* and *Penicillium oxalicum*. This work contributed to the knowledge of bacteria producing exoenzymes demonstrating the potential of these isolates for industrial application. This work contributed to the knowledge of bacteria producing exoenzymes demonstrating the potential of these isolates for industrial application.

Furthermore, the production of bioactive substances can provide support for the development of new drugs.

**Keywords:** *Acrocomia aculeata*, macaw, bacteria, exoenzymes, antagonism.

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aumento da temperatura global causado pela queima de combustíveis fósseis e a futura escassez destas fontes de energia são alguns dos atuais problemas enfrentados em relação ao suprimento da demanda energética mundial. Neste contexto, a substituição gradativa de combustíveis derivados do petróleo por fontes de energia renováveis e alternativas apresenta-se como uma importante e fundamentada iniciativa em busca da preservação ambiental.

Os biocombustíveis apresentam uma série de vantagens ambientais em relação aos combustíveis derivados do petróleo, uma vez que são atóxicos, biodegradáveis, renováveis e apresentam um baixo perfil de emissão de poluentes. Dentre os biocombustíveis, destaca-se o biodiesel, produzido principalmente a partir de óleos vegetais.

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) tem despertado a atenção nas últimas décadas pela propriedade oleaginosa dos frutos com potencial para produção de biodiesel, que pode chegar a  $4.000 \text{ L} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ . A espécie é produtiva após 4 anos de crescimento, e essa produtividade pode estender por mais de 100 anos. Dentre as oleaginosas com potencial para produção de biodiesel como a soja, mamona, milho e colza, a macaúba se destaca, perdendo apenas para o dendzeiro (*Elaeis guineensis*) em termos de produtividade. No entanto, a macaúba ao contrário do dendê é adaptada a condições de clima seco, necessitando de pouca água.

Atualmente, devido aos fatores já citados, o plantio da macaúba representa importância socioeconômica, no entanto, é realizada de forma extrativista por pequeno número de produtores, carecendo de informações relacionadas à espécie que permitam a coleta, armazenamento e processamento dos frutos de forma adequada, garantindo a qualidade do óleo para produção de biodiesel.

O conhecimento da microbiota associada aos frutos da macaúba pode contribuir para a melhoria do manejo da espécie, incluindo as etapas de coleta, armazenamento e processamento dos cocos, uma vez que enzimas microbianas estão relacionadas ao processo de deterioração dos frutos e ainda contribuem para o aumento dos níveis de acidez do óleo tornando-o inviável para produção de biodiesel.

Nesse contexto, o isolamento das bactérias associadas aos frutos da macaúba, bem como a análise da produção de exoenzimas por esses micro-organismos, tais como amilases, lipases, celulases, xilanases, proteases e pectinases, além de permitir o planejamento de estratégias na melhoria da qualidade do óleo para produção de biodiesel podem permitir a aplicação biotecnológica desses micro-organismos, uma vez que essas enzimas são amplamente empregadas nas indústrias têxtil, alimentícia, de papel e farmacêutica.

Estudos etnobotânicos apontam que diferentes partes de *A. aculeata* (raiz, folha, mesocarpo, semente) apresentam propriedades medicinais, tais como fortificante, diurético, hipotensor, febrífugo e analgésico. Estudos de outras espécies vegetais apontam que algumas propriedades medicinais estejam relacionadas à produção de metabólitos secundários por micro-organismos associados à planta. Dessa forma, outro aspecto a ser analisado relacionado à microbiota associada aos frutos da macaúba é a produção de substâncias bioativas.

O aumento no número de infecções fúngicas e bacterianas, o aumento das doenças recorrentes em pessoas com órgãos transplantados, a recente emergência de velhos e novos patógenos (micobactérias, anaeróbios), o problema de infecções virais, doenças neoplásicas e o surgimento de resistência dos micro-organismos são alguns dos fatores que determinam a necessidade da descoberta de novos fármacos. Devido aos grandes problemas gerados pela falta de novos medicamentos, existe uma urgência para a descoberta de novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos que sejam mais efetivos, possuam baixa toxicidade e tenham poucos impactos ambientais.

Metabólitos secundários produzidos por micro-organismos associados à plantas têm sido amplamente investigados como fontes promissoras na descoberta de substâncias antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias. Portanto, o estudo das bactérias associadas aos frutos da macaúba (*A. aculeata*), quanto à capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas drogas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Macaúba (*Acrocomia aculeata*)

Membro da família *Arecaceae* e popularmente conhecida como macaúba, a *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart é uma palmeira arborescente, de caule simples e cilíndrico, cujo estipe pode atingir até 16m de altura e 20-30cm de diâmetro (Figura 1a) (Abreu et al., 2011; Nucci, 2007). Dentre as características da espécie, destacam-se ainda, suas folhas verdes e alternas que podem variar de 2 a 4m de comprimento, flores amarelas e unissexuais no qual ambos os sexos aparecem na mesma inflorescência, variando de 50-80cm de comprimento (Figura 1b), região caulinar revestida por espinhos finos e estipe coberta pela base dos pecíolos, que permanece aderida por vários anos (Lisingen & Cervi, 2009; Lorenzi, 2006).

A espécie nativa de florestas tropicais distribuiu-se abundantemente por toda América tropical, ocorrendo desde o sul do México até o sul do Brasil, Paraguai e Argentina (Abreu et al., 2011; Nucci, 2007). Habita preferencialmente regiões com estação chuvosa bem definida e de baixas altitudes, áreas abertas e com alta incidência solar, desenvolvendo-se bem em solos arenosos e em locais com solos férteis (Lisingen & Cervi, 2009).

A dispersão é facilitada através da larga produção de frutos, que são consumidos por animais (Oliveira et al., 2012). Os Coleópteros são os principais polinizadores; a frutificação ocorre durante todo ano e os frutos amadurecem principalmente entre setembro e janeiro (Lisingen & Cervi, 2009; Lorenzi, 2006). Os frutos da macaúba apresentam 2-5cm de comprimento, forma de drupa globosa e quando maduros apresentam coloração amarelo-esverdeada, sugerindo presença de carotenóides, propiciando, dessa forma, seu uso na alimentação (Figura 1c, 1d) (Argandoña, 2011; Galvani & Fernandes 2010; Lisingen & Cervi, 2009). Além disso, o óleo presente no fruto apresenta potencial para a indústria de cosméticos e matéria prima para a produção de biocombustíveis (Abreu et al., 2011).



**Figura 1:** a) Visão geral da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Lorenzi, 2000); b) Inflorescência de macaúba (Nucci, 2007); c) Fruto imaturo da macaúba (Nucci, 2007); d) Fruto maduro seccionado de macaúba (Acrotech, 2012).

## 2.2 Macaúba e biodiesel

A futura escassez da oferta de petróleo, aliada ao aumento dos preços de seus combustíveis derivados e a crescente preocupação com as questões ambientais relacionadas à queima de combustíveis fósseis induzem a mudança da atual matriz energética para combustíveis alternativos, destacando-se os biocombustíveis (Lima et al., 2008; Lôbo et al., 2009).

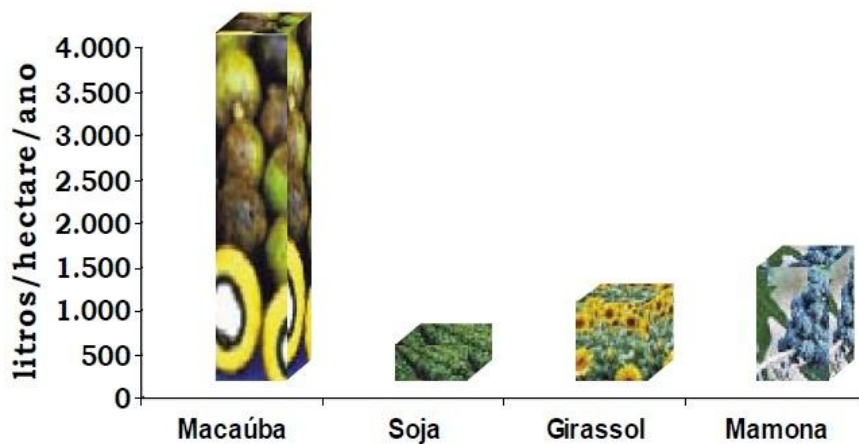
A biomassa tem atraído a atenção nos últimos tempos por se tratar de uma fonte de energia renovável e seu uso sustentável não trazer danos ao meio ambiente. Entre as fontes de biomassa, destacam-se os óleos vegetais, por proporcionar uma fonte descentralizada de energia e um apoio à agricultura familiar (Ramos, 2003). O biodiesel, uma fonte alternativa, é produzido principalmente a partir de óleos vegetais, derivado da polpa ou semente de oleaginosas (Lima et al., 2008).

A macaúba tem sido caracterizada como espécie promissora para produção de biodiesel, devido o alto teor de óleo presente no fruto (Neto, 2012). A palmeira pode ser produtiva por mais de 100 anos, sendo que, a alta produtividade é alcançada após quatro anos de crescimento (Moura et al., 2010). A produtividade de óleo vegetal pode chegar a  $4.000 \text{ L} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$  (Figura 2) (Nucci, 2007; Oliveira et al., 2012). Entre as plantas oleaginosas, a macaúba é a segunda mais produtiva ( $1500$  a  $5000 \text{ kg óleo ha}^{-1}$ ), inferior apenas ao dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (Moura et al., 2010).

Em Minas Gerais, a regulamentação da lei nº 19.485/2011 – Pró-Macaúba, instituiu a política estadual de incentivo ao cultivo, à extração, à comercialização, ao consumo e à transformação da macaúba e das demais palmeiras oleaginosas, demonstrando dessa forma, a demanda crescente por energias renováveis, que atendam as diretrizes de sustentabilidade ambiental, social e econômica definidas no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (Filho et al., 2012).

O cultivo da macaúba é realizado por um grande número de pequenos produtores, caracterizando importância socioeconômica, no entanto, é realizado de forma extrativista (Manfio, 2012). Dentre os impactos negativos da ação extrativista, destacam-se o decréscimo na taxa de produção das sementes, germinação e estabelecimento das plântulas; ruptura do processo de interação planta-animal e diminuição da reposição de nutrientes do solo (Lorenzi, 2006).

Apesar da alta potencialidade da macaúba para geração de renda, verifica-se ausência de informações botânicas, ecológicas e agronômicas que possibilitariam a implantação de sistemas de cultivo ou manejo sustentável da espécie, sendo que, o estabelecimento do plano de manejo adequado permitiria o uso racional dos recursos naturais, fornecendo ainda, benefícios para famílias brasileiras (Lorenzi, 2006).



**Figura 2:** Comparação da capacidade produtiva de óleo vegetal entre algumas espécies de oleaginosas (Adaptado de Nucci, 2007).

### 2.3 Micro-organismos associados à planta

A disponibilidade de nutrientes e a considerável estabilidade ambiental torna a fitosfera um atrativo habitat para os micro-organismos (Saito et al., 2007).

Micro-organismos que colonizam a superfície de órgãos vegetais são conhecidos como epifíticos (Saikonen et al., 2004). Já os micro-organismos conhecidos como endófitos colonizam o interior dos tecidos saudáveis da planta, sendo o tecido hospedeiro transitoriamente assintomático (Ding et al., 2010). Esse termo pode ser aplicado para bactérias, fungos e algas que passam toda vida ou parte do seu ciclo de vida na região do apoplasto ou simplasto dos tecidos da planta hospedeira (Gond et al., 2012). Muitas espécies podem ainda desenvolver colonização endofítica e epifítica possuindo, dessa forma, capacidade de oscilar entre esses dois nichos (Sobral et al., 2004).

Embora a relação planta-endófito tenha sido relatada como relação de mutualismo, estudos mais recentes mostram que essa interação é ainda mais complexa, envolvendo fluxos multidirecionais, influência de fatores bióticos e abióticos e interação de múltiplas espécies (Saikkonen et al., 2004).

Estima-se que cada uma das 300 mil espécies de plantas vasculares existentes no planeta seja hospedeira de um ou mais endófitos (Strobel et al., 2004). Apesar de ser grande a diversidade de plantas e o número de micro-organismos endofíticos associados a elas ser ainda maior, pouco é conhecido sobre a microbiota associada às espécies vegetais. Segundo Rosenblueth & Martínez-Romero (2006) este fato pode ocorrer devido à dificuldade de isolamento e cultivo de alguns desses endófitos. Tentativas para avaliar a população microbiana de determinada planta podem gerar resultados variados dependendo do meio de cultivo utilizado para isolamento, condições de crescimento da planta hospedeira, localização geográfica da planta, maneira pela qual o tecido vegetal foi processado, dentre outros (Lodewyckx et al., 2002). Fatores como a rotação de culturas, a idade da planta e alterações no solo podem modificar as populações ou densidade de patógenos e também a diversidade da microbiota endofítica (Hallmann et al., 1997; Islan et al., 2010).

Alguns endófitos podem ser verticalmente transmitidos à próxima geração da planta por meio das sementes, e alguns fungos podem ser transmitidos horizontalmente por meio de esporos dispersos pelo ar (Hartley & Gange, 2009).

Os micro-organismos podem penetrar na planta hospedeira para obter água e nutrientes, por meio da degradação na parede celular, criando dessa forma, lesões nos tecidos vegetais por meio de disrupção enzimática ou física (Hématy et al., 2009). Alguns estudos relatam o papel da interação entre micro-organismos endofíticos e epifíticos e seus hospedeiros. Bactérias epifíticas beneficiam dos exsudatos das raízes (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Endófitos colonizam os tecidos vegetais saudáveis e em troca obtém nutrição e abrigo, estando em uma situação favorável para promover o crescimento da planta, sintetizando fitormônios e enzimas, fixando nitrogênio atmosférico, podendo ainda possibilitar o controle biológico de patógenos, por meio da produção de metabólitos funcionais, tais como alcalóides, macrolactonas e esqueletos ciclopeptídicos (Bérdy, 2005; Gond et al., 2012; Granér et al., 2003, Saikkonen et al., 2004; Yrjälä et al., 2010).

#### **2.4 Síntese de exoenzimas por bactérias**

As enzimas são proteínas vitais capazes de catalisar reações bioquímicas com alta especificidade, aumentando em até  $10^{14}$  vezes a velocidade das reações das quais participam (Oliveira et al., 2006). Enzimas de origem microbiana são utilizadas em larga escala na indústria têxtil, na fabricação de papel, detergente, alimentos, produtos farmacêuticos e na biologia molecular (Carrim et al., 2006; Oliveira et al., 2006). Depois dos antibióticos as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica (Oliveira et al., 2006).

A maioria das enzimas comercialmente utilizadas são produzidas por micro-organismos (Sharma et al., 2001). Dentre as características que conduzem à utilização das enzimas de origem microbiana, destacam-se a susceptibilidade a manipulação genética, ampla diversidade bioquímica, rápido crescimento dos micro-organismos em meios de cultivo de baixo custo e alta produtividade em um curto período de tempo, apresentando desta forma, vantagens em relação às enzimas de origem vegetal e animal (Andualema & Gessesse, 2012; Carrim et al., 2006; Hasan et al., 2006; Oliveira et al., 2006). Além disso, enzimas de origem microbiana apresentam maior estabilidade, quando comparadas com enzimas de origem animal e vegetal (Hasan et al., 2006).

Apenas cerca de 2% dos micro-organismos presentes no mundo foram testados quanto à capacidade de produção enzimática, sendo que linhagens bacterianas são as mais utilizadas, por apresentarem atividades mais altas, quando comparadas com leveduras e fungos filamentosos (Hasan et al., 2006).

As enzimas microbianas apresentam importantes implicações ecológicas. A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como celulases, proteases, amilases pode contribuir grandemente para o crescimento e sobrevivência da população bacteriana (Gorlach-Lira & Coutinho, 2007). Além disso, as bactérias desempenham importante papel na decomposição de matéria orgânica vegetal por meio da produção de exoenzimas, contribuindo assim, para o fluxo de energia e ainda para a liberação de  $\text{CO}_2$  atmosférico (Hendricks et al., 1995).

Há sempre uma chance de encontrar micro-organismos produtores de novas enzimas e com propriedades cada vez melhores para a aplicação industrial. As características físico-químicas de diferentes habitats influenciam o desenvolvimento de numerosas adaptações moleculares, por parte dos micro-organismos. A diversidade

microbiana é o recurso mais importante para a obtenção de novos produtos e processos biotecnológicos (Gupta et al., 2002).

### 2.4.1 Amilases

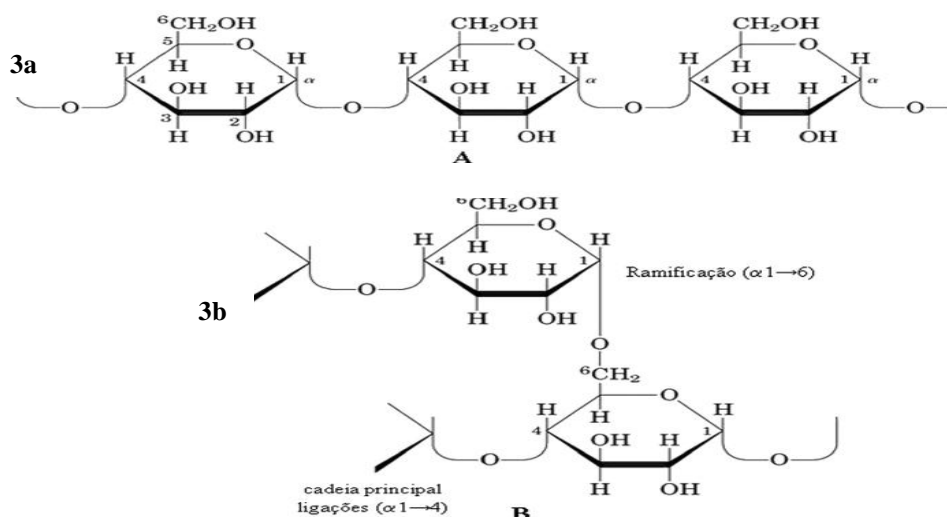
O amido é um polímero de glicose constituído de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído de até 6000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) (Figura 3a), já a amilopectina consiste em pequenas cadeias lineares de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4) e cadeias laterais unidas por ligações  $\alpha$ -(1,6) (Figura 3b) (Maarel et al., 2002).

As amilases são enzimas com capacidade de hidrolisar moléculas de amido, resultando em polímeros progressivamente menores constituídos de unidades de glicose (Chen et al., 2005). As endoamilases clivam ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) nas cadeias de amilose e amilopectina, já as exoamilases, como a  $\beta$ -amilase, glucoamilase e amiloglucosidase, clivam tanto ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4), quanto  $\alpha$ -(1,6) (Agrawal et al., 2005; Maarel et al., 2002).

Essas enzimas apresentam importância biotecnológica devido às diversas aplicações industriais. Na panificação, as amilases hidrolisam o amido presente na farinha, aumentando assim, a taxa de fermentação por leveduras; além disso, são utilizadas no pré-tratamento de alimentos para animais aumentando a digestibilidade das fibras, e na clarificação de cervejas e sucos (Agrawa et al., 2005; Souza & Magalhães, 2010). As amilases presentes na formulação de detergentes degradam resíduos de alimentos ricos em amido, apresentando dessa forma, capacidade de remoção de manchas. Essas enzimas são utilizadas ainda nas indústrias farmacêutica, têxtil e de papel (Chen et al., 2005; Khokhar et al., 2011; Souza & Magalhães, 2010).

Embora sejam produzidas por diferentes organismos, tais como plantas e animais, as amilases de origem microbiana geralmente atendem a demanda industrial (Gupta et al., 2003; Souza e Magalhaes, 2010). Dentre as amilases utilizadas na indústria, destacam-se as de origem fúngica e bacteriana, sendo o gênero *Bacillus* o principal produtor de  $\alpha$ -amilase de aplicação industrial (Khokhar et al., 2011; Gupta et al., 2002; Souza e Magalhaes, 2010).

Devido à importância industrial das amilases, há um contínuo interesse no isolamento de linhagens bacterianas produtoras de amilases, e que sejam bem adaptadas às aplicações industriais (Chen et al., 2005).



**Figura 3:** Polímeros constituintes do amido; a) Estrutura química da amilose; b) Estrutura química da amilopectina (<http://qnint.sbgq.org.br>)

## 2.4.2 Lipases

O papel fisiológico das lipases é hidrolisar triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (Hansan et al., 2006).

Essas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais, e micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (Ghasemi, 2011). As lipases microbianas apresentam várias aplicações, nas indústrias têxteis, de alimentos, cosméticos, farmacêutica, agroquímico e tratamento de águas residuárias, no entanto, a maior aplicação dessas enzimas é na formulação de detergentes, que corresponde a 32% da produção comercial de lipases (Ghasemi, 2011; Sharma et al., 2001).

A maioria das lipases usualmente comercializadas são de origem microbiana, e as lipases bacterianas apresentam-se mais estáveis quando comparadas às de origem animal e vegetal (Hansan et al., 2006; Willerding et al., 2011). Micro-organismos produtores de lipases têm sido isolados de oleaginosas, laticínios, solo contaminado com óleo, alimentos em decomposição e resíduos industriais (Sharma et al., 2001).

Os diferentes tipos de reações que as lipases podem catalisar na ausência de cofator, a alta estabilidade em solventes orgânicos e a capacidade de catalisar reações específicas, demonstram o potencial dessas enzimas na aplicação biotecnológica (Ghasemi, 2011).

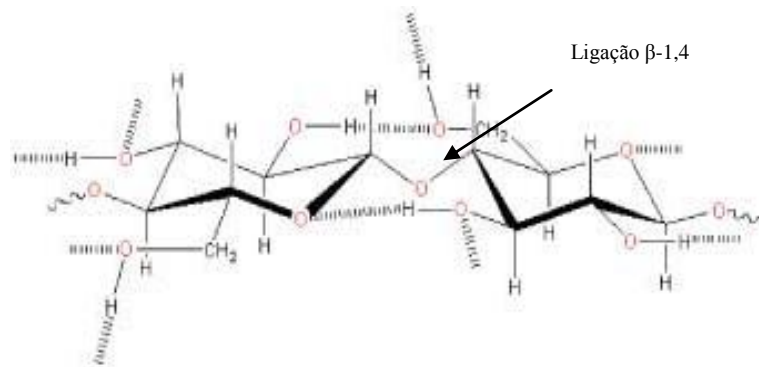
### 2.4.3 Celulases

A celulose constitui o polímero mais abundante do planeta, sendo encontrada como constituinte estrutural da parede celular de plantas e algas. No entanto, este polímero não se acumula no ambiente devido à existência de fungos e bactérias celulolíticas, desempenhando importante papel na ciclagem de carbono na biosfera (Quiroz-Castaneda & Folch-Mallol, 2011).

Como alternativa para produção de biocombustíveis, no lugar de combustíveis fósseis, a celulose tem despertado a atenção nas últimas décadas (Watanabe et al., 2012). Formada por unidades de D-glucose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 e ligações de hidrogênio responsáveis pela formação das fibras (Figura 4), a celulose ao ser clivada por celulases resulta em açúcares passíveis de serem convertidos para produção de bioetanol (Deswal et al., 2012; Lin et al. 2012; Watanabe et al., 2012).

O mecanismo de hidrólise da celulose envolve a ação sinérgica de três enzimas: endo- $\beta$ -1,4-glucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase (Lin et al., 2012). As exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia de celulose e liberam como produto  $\beta$ -celobiose, enquanto as endoglucanases atacam randomicamente ligações O-glicosídicas, resultando em cadeias de diferentes comprimentos. As  $\beta$ -glicosidases por sua vez agem especificamente nos dissacarídeos da  $\beta$ -celobiose, produzindo glicose (Kuhad et al., 2011).

Dentre as bactérias celulolíticas, destacam-se gêneros como *Pseudomonas* e Actinomicetos, *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Clostridium* (Heck et al., 2002).



**Figura 4:** Estrutura química linear da celulose (Donini et al., 2010).

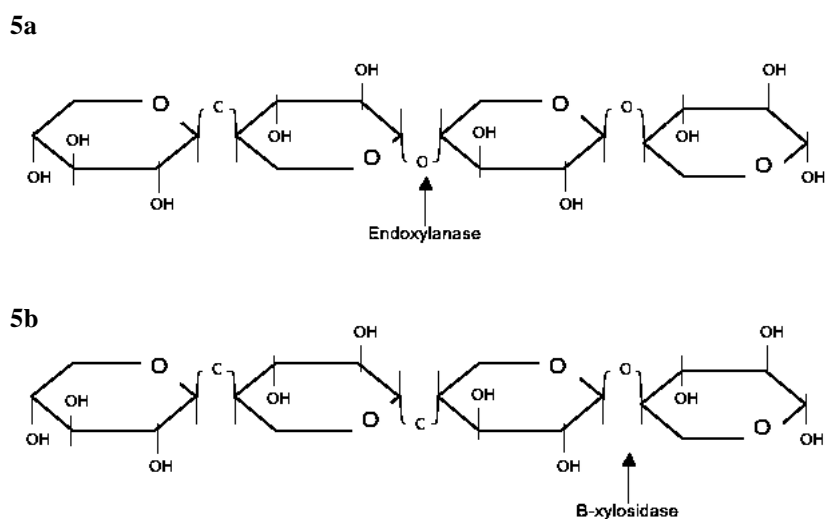
#### 2.4.4 Xilanases

A Xilana é a mais abundante das hemiceluloses, um polímero estrutural constituído de resíduos de D-xilopirranose, unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (Heck et al., 2002; Kim et al., 2009; Uffen, 1997). Várias enzimas constituem a família das xilanases, clivando a xilana em diferentes sítios e produzindo diferentes produtos. Existem três tipos principais: endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases, ou endoxilanases que clivam a xilana por meio da hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 (Figura 5a),  $\beta$ -D-xilosidases, ou xilosidases que clivam unidades monoméricas de xilose a partir da extremidade não redutora de um polímero (Figura 5b), e demais enzimas que clivam grupos específicos da cadeia polimérica (Goldman, 2009; Uffen, 1997).

Esse polímero está presente na parede celular de plantas lenhosas e no material de reserva das sementes, sendo ainda a segunda fração vegetal mais abundante na natureza, compreendendo mais de 30% do carbono orgânico renovável do planeta (Goldman, 2009; Heck et al., 2002).

Bactérias e fungos produtores de xilanases estão amplamente distribuídos na natureza. Alguns desses micro-organismos são saprofíticos, outros são de vida livre, sendo encontrados no solo ou na água, e ainda no intestino de animais herbívoros ou insetos (Kim et al., 2009; Uffen, 1997). Xilanases microbianas têm despertado interesse nas últimas décadas, devido às inúmeras aplicações em vários processos industriais, tais como, melhoria nutricional de materiais lignocelulósicos, clarificação de sucos e vinhos e produção de papel (Goyal, 2008).

Xilanases produzidas por bactérias apresentam maior estabilidade e temperatura ótima mais elevada, quando comparadas com xilanases de origem fúngica (Bakri et al., 2008). Dentre os gêneros bacterianos que apresentam atividade xilanolítica, destacam-se *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Bacteroides* (Uffen, 1997).



**Figura 5:** Pontos de clivagem na xilana, por endoxilanases (a) e xilosidades (b) (Goldman, 2009).

#### 2.4.5 Proteases

As proteases estão entre as principais enzimas de interesse industrial, dominando o mercado de enzimas com aproximadamente 40% do total de vendas (Gupta et al., 2002; Sharma et al., 2001).

O melhoramento de técnicas na produção, purificação e caracterização de proteases microbianas permite o sucesso na aplicação em larga escala dessas enzimas no tratamento de couros, produção de laticínios, detergentes, nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos (Dutta & Banerjee, 2006; Rai & Mukherjee, 2009).

O aumento do uso industrial de proteases tem conduzido à necessidade de descoberta de proteases mais específicas, capazes de agir em determinados substratos sem interferir em outros, e que apresentem características bem definidas para utilização no processo de escolha (Rodarte et al., 2011).

Brar & colaboradores (2007) relatam o papel funcional das proteases bacterianas, que podem ser intracelulares, participando de processos metabólicos, tais como diferenciação celular, esporulação e maturação enzimática ou extracelulares, catalisando a hidrólise de proteínas presentes no meio, podendo as células bacterianas a partir daí, absorverem e utilizarem os produtos hidrolisados.

As proteases de origem bacteriana destacam-se, quando comparadas às proteases produzidas por leveduras, fungos, plantas e animais, uma vez que são facilmente produzidas em larga escala, termoestáveis e atingem uma ampla faixa de pH (Banik & Prakash, 2004). A maioria das serinas proteases alcalinas, grupo dominante de proteases produzidas por micro-organismos, é produzida por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (Banerjee et al., 1999; Brar et al., 2007). Dentre as espécies empregadas industrialmente na produção de proteases destacam-se *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus* (Gupta et al., 2012).

#### **2.4.6 Pectinases**

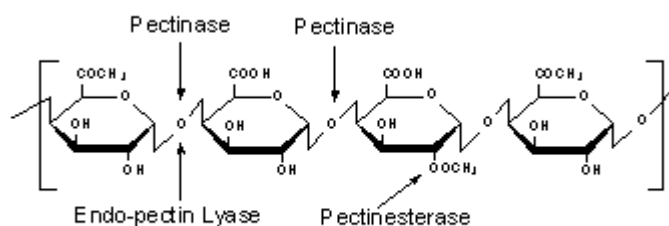
Enzimas pectinolíticas catalisam a degradação de substâncias pécticas (Phutela et al., 2005). Estas substâncias formam um complexo de polissacarídeos ácidos, compostos de unidades de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -(1,4) parcialmente esterificados e neutralizados por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (Figura 6) (Alkorta et al., 1997).

As pectinas formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores (Uenojo & Pastore, 2007).

As pectinases podem ser divididas em dois grupos, as esterases, como a esterase de pectina (PE), que hidrolisa grupos metil éster da pectina, e depolimerases, representadas por poligalacturonase (PG) que hidrolisa ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) entre as unidades não esterificadas de ácido galacturônico, e pectato liase (PL) que cliva ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) por trans-eliminação do ácido péctico (Alkorta et al., 1997; Damásio et al., 2011; Uenojo & Pastore, 2007).

Atualmente, as pectinases correspondem a aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas (Uenojo & Pastore, 2007). Algumas das aplicações dessas enzimas na indústria de alimentos incluem o amadurecimento de frutas, clarificação e redução da viscosidade em sucos de fruta, extração da polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate (Castilho et al., 1999; Uenojo & Pastore, 2007). Além disso, as pectinases vêm sendo utilizadas na extração de óleos, flavonóides e pigmentos de plantas, no tratamento de resíduos vegetais, na nutrição animal, e na degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel (Castilho et al., 1999; Damásio et al., 2011; Uenojo & Pastore, 2007).

As pectinases são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, no entanto, a maioria das pectinases alcalinas são de origem bacteriana, principalmente de bactérias do gênero *Bacillus* (Kashyap, 2001; Uenojo & Pastore, 2007).



**Figura 6:** Estrutura química da pectina (<http://www.sigmaldrich.com>)

## 2.5 Bactérias e produtos bioativos

Metabólitos secundários têm sido à base de numerosos produtos farmacêuticos que variam desde antibióticos a imunossupressores. Esses compostos de baixo peso molecular podem ser produzidos em resposta a algum tipo de efeito do ambiente, podendo ainda desempenhar importante papel na interação microbiana atuando como reguladores microbianos, fatores de crescimento e componentes de sinalização (Bérdy et al., 2005; Coleman et al., 2011).

Bactérias endofíticas são relativamente pouco estudadas e consideradas como fonte potencial de novos produtos naturais de aplicação na medicina, agricultura e indústria (Muzzamal et al., 2012). Produtos naturais de origem microbiana têm sido responsáveis por produzir uma ampla variedade de metabólitos capazes de inibir ou matar uma grande variedade de agentes incluindo fitopatógenos e bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (Strobel & Daisy, 2003; Bérdy, 2005).

Bactérias antagonistas apresentam a capacidade de inibir o crescimento de outros organismos. Uma das estratégias dessas bactérias para inibir o crescimento de outros micro-organismos é excretar metabólitos antifúngicos, que geralmente são antibióticos, toxinas e biosurfactantes (Kai et al., 2007; Raaijmakers et al., 2002). Tanto micro-organismos epifíticos quanto os endofíticos podem estabelecer com a planta hospedeira relações antagônicas, sinérgicas, regulatórias e moduladoras a partir dos metabólitos secundários excretados por eles (Bérdy, 2005).

O conhecimento da interação epífita-micro-organismo alóctone é uma importante base para criação de tecnologias ou práticas culturais para limitar ou excluir a sobrevivência de enteropatógenos na filosfera. Heaton & Jones (2008) relatam a produção de substâncias antagonistas produzidas por bactérias epifíticas capazes de inibir o estabelecimento de patógenos entéricos em superfícies de hortaliças. O estudo de bactérias associadas às plantas é importante não somente para o entendimento do papel ecológico da interação bactéria-hospedeiro, mas também para a aplicação biotecnológica desses micro-organismos (Yrjälä et al., 2010).

No grupo dos procariotos, espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são os produtores mais frequentes de antibióticos e produtos naturais similares (Bérdy, 2005). Com a descoberta da estreptomicina, e mais tarde do cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos a atenção voltou-se para as espécies de *Streptomyces*. Nos anos 50 e 60 a maioria dos antibióticos (~70%) foi descoberta a partir dessas espécies (Bérdy, 2005).

Enquanto plantas são amplamente estudadas como fonte de metabólitos bioativos, os micro-organismos associados aos seus tecidos têm recebido pouca atenção, representando uma abundante fonte de novos componentes químicos bioativos (Strobel et al., 2004).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar bactérias associadas aos frutos da macaúba (*A. aculeata*) coletados diretamente da palmeira e com diferentes períodos de deposição no solo e avaliá-las quanto à produção de exoenzimas de interesse industrial e metabólitos com atividade antimicrobiana.

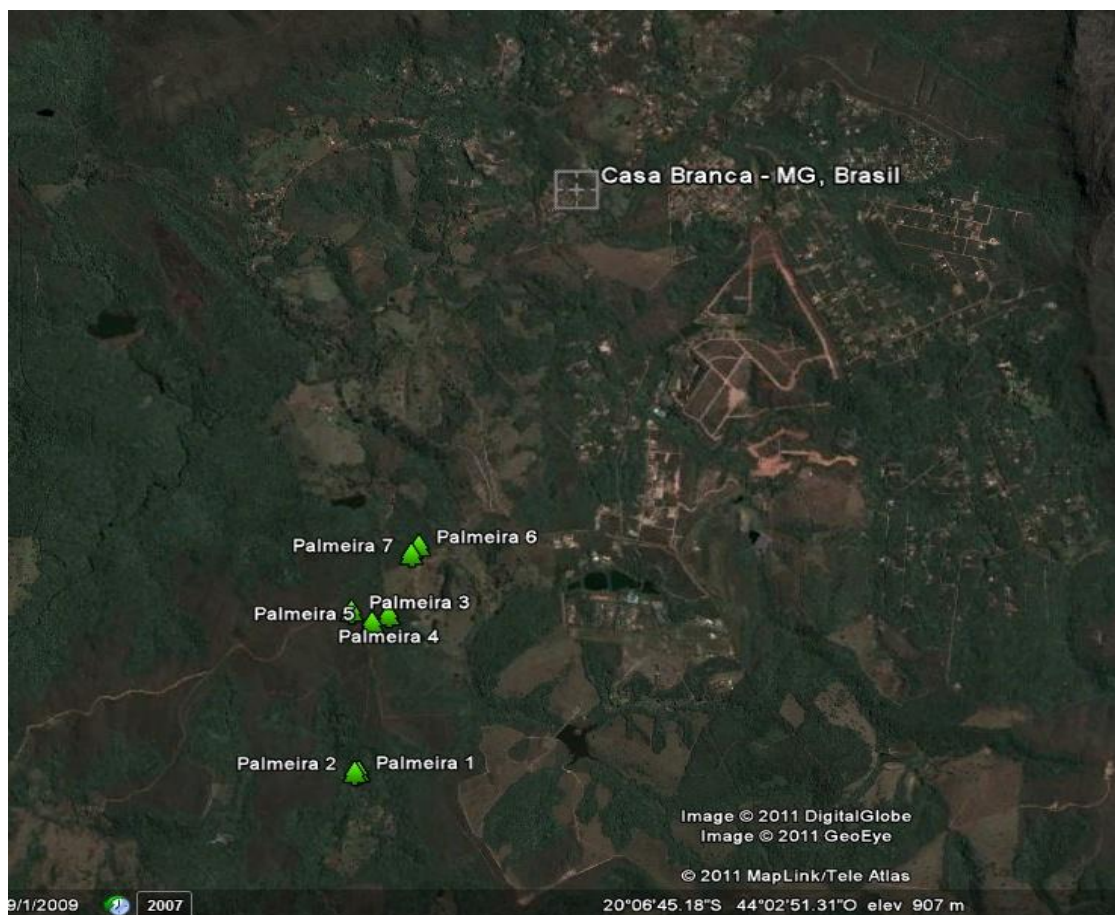
#### 3.2 Objetivos Específicos

- Coletar os frutos da macaúba (*A. aculeata*) diretamente do cacho e com diferentes períodos de deposição no solo de uma população de ocorrência natural em Casa Branca, Brumadinho-MG;
- Isolar e identificar bactérias epifíticas, endofíticas e associadas à polpa dos frutos da macaúba; por meio de técnicas moleculares utilizando os iniciadores 8F e 907R;
- Avaliar o potencial das bactérias isoladas quanto à produção em meio sólido das exoenzimas amilase, lipase, celulase, xilanase, protease e pectinase;
- Preparar extratos orgânicos dos isolados bacterianos obtidos;
- Depositar os extratos bacterianos obtidos na extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Fiocruz-MG, para estudos de bioprospecção;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados bacterianos contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. Krusei*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium oxalicum* por meio do teste de difusão em agar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de coleta e amostragem

A região selecionada para coleta dos frutos da macaúba foi Casa Branca, situado em um vale na região serrana (sul) da grande Belo Horizonte, no entorno do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça, município de Brumadinho, Minas Gerais (Figura 7).



**Figura 7:** Imagens de satélite da região de Casa Branca, município de Brumadinho – Minas Gerais, e a localização aproximada das palmeiras onde foram coletados os frutos.

Neste trabalho foram realizadas seis coletas sistemáticas nos meses de Abril e Maio de 2011. Na primeira coleta foram selecionadas ao acaso 7 palmeiras de formação nativa, e coletados 4 frutos de cada palmeira  $T_0$  (Coleta na palmeira antes da queda natural). Ainda nesta primeira coleta, 20 frutos de cada uma das 7 palmeiras foram depositados no solo próximo as palmeiras, no interior de sacos de nylon tipo

engranzamento e protegidos com uma tela de viveiro (Figura 8), sendo que cada saco continha 4 cocos. Nas coletas subsequentes, 4 frutos de cada uma das palmeiras, foram coletados com 7, 14, 21, 28 e 35 dias de permanência no solo. A coleta de frutos com diferentes períodos de deposição no solo teve como objetivo simular as condições de coleta dos frutos pelas populações rurais e ainda avaliar o efeito da exposição a diferentes intempéries (umidade, temperatura, contato com solo e danos físicos) na microbiota associada aos frutos.

Após a coleta em campo, os frutos foram transportados para o Laboratório de Microbiologia Aplicada sob refrigeração, onde foi realizado o processamento das amostras e isolamento da microbiota associada aos frutos.



**Figura 8:** Armazenamento dos frutos da macaúba sob a palmeira.

## **4. 2 Isolamento e preservação de bactérias associadas aos frutos da macaúba**

### **4.2.1 Isolamento e preservação de bactérias epifíticas associadas aos frutos da macaúba**

Para o isolamento das bactérias epifíticas, 100mL de solução salina estéril (0,85%) foi adicionado em sacos plásticos de primeiro uso, no qual estavam os cocos.

Estes sacos foram imersos em aparelho ultrassônico por 10min. Em seguida, 1mL desta solução foi diluída serialmente e 100 µL de cada uma das diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) foram plaqueadas em meio TSA (Trypic Soy Agar) 5% (Difco – USA), suplementado com Benomyl 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA), utilizado para inibir o crescimento fúngico. As placas foram incubadas a 37°C por até 72h, durante esse período os diferentes morfotipos foram enumerados (UFC/g) e purificados em novas placas de Petri contendo meio TSA. Os isolados bacterianos obtidos foram preservados em caldo nutriente com 20% de glicerol a – 80 °C e mantidos por repiques sucessivos em tubos contendo agar nutriente inclinado, mantidos a 4 °C. Todos os isolados obtidos durante o estudo foram depositados na Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada.

#### **4.2.2 Isolamento e preservação de bactérias endofíticas da casca dos frutos da macaúba**

Para o isolamento das bactérias endofíticas, os cocos coletados foram, inicialmente, limpos superficialmente com detergente neutro e enxaguados com água em abundância. Três fragmentos do epicarpo, de tamanhos semelhantes (aproximadamente 1cm<sup>2</sup>) foram retirados do fruto com o auxílio de uma micro retífica, sendo posteriormente imersos em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio (3 minutos) e água destilada (2 minutos). Após a desinfecção superficial, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Trypic Soy Agar) 5% (Difco – USA) suplementado com Benomyl 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) para inibição do crescimento fúngico. Após incubação a 28°C por até 72 horas, os diferentes morfotipos foram enumerados (UFC/g) e purificados em novas placas de Petri contendo meio TSA. O método de preservação destes micro-organismos foi realizado de acordo com os protocolos descritos no item 4.2.1.

### **4.2.3 Isolamento e preservação de bactérias associadas à polpa dos frutos da macaúba**

Para o isolamento de bactérias associadas à polpa, 1g do mesocarpo de cada fruto foi triturado em Ultra Turrax (Marconi, Brasil) com 9 mL de solução salina estéril (0,85%). Em seguida, alíquotas de 1 ml desta suspensão foram diluídas serialmente. De cada uma das diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), alíquotas de 100  $\mu$ L foram plaqueadas em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar) 5% (Difco – USA) suplementado com Benomyl 50  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich, EUA) para inibição do crescimento fúngico. Após incubação a 37°C por até 72h, os diferentes morfotipos foram enumerados (UFC/g) e purificados em novas placas de Petri contendo meio TSA. O método de preservação destes micro-organismos foi realizado de acordo com os protocolos descritos no ítem 4.2.1.

## **4.3 Identificação das bactérias**

### **4.3.1 Extração do DNA total**

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo de Pitcher e colaboradores, (1989), com modificações. Os isolados foram previamente cultivados em meios agar BHI ou TSA por 24h a 37°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspendidas em 300 $\mu$ L de tampão TE (Tris-EDTA+lisozima) adicionadas de uma porção de vidro triturado, e em seguida, homogeneizados em agitador de tubos do tipo vortex por 2min. Após incubação em banho-maria a 37°C por 2h, 600 $\mu$ L da solução de tiocianato de guanidina 5 mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 100mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e sarcosil 0,5% foram adicionados aos tubos, os quais foram agitados por inversão e incubados por 10min a temperatura ambiente. Em seguida, 300 $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 mol.L<sup>-1</sup> foram adicionados a resuspensão e os tubos foram novamente agitados por inversão e incubados por 10min em banho de gelo. Após essa etapa, 600 $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados e os tubos centrifugados a 9.000g por 10min. A fase aquosa foi transferida para novos tubos de microcentrífuga de 2mL e o mesmo volume de isopropanol foi acrescentado a cada tubo. Ao final desse processo, as amostras foram incubadas a -20°C por 12h e centrifugados a 4.000g por 20min. O

sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70%. Essa etapa foi repedita duas vezes, e o sedimento foi suspenso em 50µL de água deionizada estéril e os tubos estocados a 4°C. O DNA foi quantificado em nanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) e a sua integridade analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **4.3.2 PCR com iniciadores 8F e 907R para amplificação da região 16S do rDNA**

Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 5µL de tampão de PCR 10x, 3µL MgCl<sub>2</sub>, 1µL dNTP 10 mmol.L<sup>-1</sup>, 1,5µL de cada iniciador (8F e 907R), 2 µL de DNA (90-120ng/mL), 35,5 µL de água deionizada estéril e 0,5 µL Taq DNA polimerase 5U. µL<sup>-1</sup>(Phoneutria). A reação foi realizada utilizando termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5min seguida de 26 ciclos com desnaturação a 94°C, anelamento inicial a 57°C e extensão a 72°C. O produto da PCR foi quantificado em nanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) e a integridade do DNA analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **4.3.3 Purificação dos amplicons usando EDTA**

Ao produto de PCR foi adicionado 11,25µL de EDTA(125 mmol.L<sup>-1</sup>) e 135µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15min a temperatura ambiente e após centrifugação a 6000g por 25min, o sobrenadante foi descartado. Alíquotas de 120µL de etanol 70% foi adicionado, a cada tubo de microcentrífuga, os quais foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 6000g por 10min e o sobrenadante novamente descartado. Após evaporação do etanol residual, o produto foi ressuspenso em 10µL de água deionizada estéril e dosado em nanodDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies).

#### **4.3.4 Reação de sequenciamento**

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado 1µL do DNA purificado (90-120ng/mL), 1µL do iniciador (8F-907R), 4 µL do pré-mix Kit DYEnamic™

(Amersha, Biosciences, USA), e 4  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril completando assim o volume final de 10  $\mu\text{L}$  para reação de PCR.

#### **4.3.5 Precipitação da reação de sequenciamento**

Para a precipitação da reação de sequenciamento 1  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio  $7,5 \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços, e em seguida adicionado 30  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (Merck). Após homogeneização com auxílio de vortex, a placa foi submetida a centrifugação a 2500g (pulso), protegida da luz e incubada por 20min a temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada por 45min a 2500g. O sobrenadante foi descartado e 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (Merck) foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente centrifugada por 10min a 2500g, e o sobrenadante novamente descartado. Após ser submetida a um pulso de 500g, a placa foi incubada por 20-40 min protegida da luz para evaporação do etanol residual. O DNA foi finalmente ressuspensionado em 10  $\mu\text{L}$  de *Loading buffer* e armazenado a 4°C, protegido da luz, até injeção em sistema MegaBACE™ 1000.

#### **4.3.6 Análise computacional das sequencias**

As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no portal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para a comparação com as sequencias depositadas no GenBank. Para o alinhamento das seqüências nucleotídicas foi utilizado o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

#### **4.4 Caracterização do potencial de produção de exoenzimas por bactérias**

Para a avaliação da produção das exoenzimas hidrolíticas: amilase, celulase, lactase, lipase, pectinase, protease e xilanase, os isolados bacterianos foram repicados por meio da técnica de esgotamento por estria em placas contendo agar nutriente (Neogen, Michigan) e incubados por 24h a 37°C. Após esse período, colônias dos isolados foram ressuspensionadas em solução salina, com o auxílio de uma alça de platina estéril, e o inóculo foi então padronizado de forma a atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland. Alíquotas de 5 $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram inoculadas, com o auxílio de uma micropipeta, em Placas de Petri contendo 20mL de meio,

adicionado do substrato sólido específico para cada enzima. Foram inoculados até 5 isolados bacterianos por placa, respeitando uma distância de 1cm da parede lateral da placa e 2cm do inóculo adjacente. Todos os testes foram realizados em duplicata. A estimativa da produção enzimática foi realizada de forma semi-quantitativa, utilizando-se um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia de cada isolado bacteriano testado.

#### **4.4.1 Amilases**

Para verificar a produção da exoenzima amilase, os isolados bacterianos, foram inoculados em agar nutriente, acrescido de amido solúvel 0,2% (Labsynth, Brazil). Posteriormente as placas de Petri foram incubadas por 24 a 72 h a 37 °C. A produção de amilase foi confirmada através da exposição das placas ao vapor de iodo metálico, observando-se halo claro ao redor das colônias produtoras de amilase, cujo diâmetro foi determinado com auxílio de paquímetro (Hankinl & Anagnostaksis, 1975).

#### **4.4.2 Lipases**

A atividade de lipases foi determinada, utilizando meio agar nutriente acrescido de 2,5% de azeite de oliva (Gallo, Portugal) e 0,4% de NaCl. Após o período de incubação de 24 a 72h a 37°C, a atividade foi determinada através da medição de halo claro ao redor das colônias bacterianas com auxílio de paquímetro (Kouker et al., 1987).

#### **4.4.3 Celulases**

A produção de celulases foi avaliada utilizando meio sólido contendo carboximetilcelulose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%, e agar 1,5%. As placas foram incubadas por 24 a 72h a 37 °C. Após o período de incubação 5 mL do corante vermelho congo (0,05%) foi adicionado sobre o agar, e após 15 minutos, as placas foram lavadas com solução de NaCl 1mol.L<sup>-1</sup>. A presença de halo claro ao redor da colônia foi indicativo de produção de celulases. A atividade celulolítica foi avaliada pela medição do diâmetro da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro (Singh et al., 2004).

#### **4.4.4 Xilanases**

Para detectar a produção de xilanases, os isolados bacterianos foram cultivados em meio constituído de xilana  $4\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $6\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $3\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $0,5\text{g.L}^{-1}$ ,  $1\text{mol.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$   $1\text{mL.L}^{-1}$ , Extrato de levedura  $1\text{g.L}^{-1}$ , Ureia  $2,5\text{g.L}^{-1}$ , e agar  $15\text{g.L}^{-1}$ . Após o período de incubação de 24 a 72h a  $37^\circ\text{C}$ , 5mL de solução reveladora (vermelho congo 0,05%) foi adicionado sobre o agar e após 15min, lavado com solução de  $\text{NaCl}$   $1\text{mol.L}^{-1}$ . A presença de halo claro ao redor do crescimento bacteriano foi indicativo da produção de xilanases, cujo diâmetro foi medido utilizando um paquímetro (Blanco & Pastor, 1993).

#### 4.4.5 Proteases

A atividade proteolítica foi determinada através da inoculação dos isolados bacterianos em meio constituído de caseína 1% e agar nutriente  $8\text{g.L}^{-1}$ . A produção de proteases foi então confirmada, pela presença de halo claro ao redor das colônias, após o período de incubação de 24 a 72h a  $37^\circ\text{C}$ , que foi medido utilizando paquímetro (Oliveira et al., 2006).

#### 4.4.6 Pectinases

A produção de pectinases foi avaliada através do cultivo dos isolados bacterianos em meio constituído de pectina  $20\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura  $1\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0,5\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4$   $0,01\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $0,01\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0,5\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$   $3\text{g.L}^{-1}$ , agar  $15\text{g.L}^{-1}$ . Após o período de incubação de 24 a 72h a  $37^\circ\text{C}$  as placas de Petri foram expostas ao vapor de iodo metálico. A atividade de pectinases foi confirmada pela presença de halo claro em volta da colônia, o qual foi medido por meio de paquímetro (Cao et al., 1992).

### 4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos isolados bacterianos foi realizada por meio do método de difusão em ágar utilizando os seguintes micro-organismos reveladores: *Aspergillus fumigatus*, gentilmente cedido pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), *Fusarium solani*, *Penicillium oxalicum*, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 298 e *Candida tropicalis* ATCC 750 gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;

*Staphylococcus aureus* ATCC 25295, *Escherichia coli* ATCC 18804 e *Bacillus cereus* ATCC 19987 pertencentes ao laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### **4.5.1 Método por difusão em ágar**

##### **4.5.1.1 Bactérias e Leveduras reveladoras**

Os isolados bacterianos obtidos neste trabalho foram inoculados em placas de Petri contendo meio BHI e incubados por 24h a 37°C. Após o período de incubação, alíquotas de 5µL das suspensões dos isolados bacterianos padronizadas (D.O: 0,05 a 0,08, leitura a 625nm) foram inoculadas em meio BHI sólido. Após incubação por 24h a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição ao clorofórmio por 20min, deixando-se, em seguida, evaporar o clorofórmio residual. As placas de Petri contendo as bactérias teste foram sobrepostas com 3,5mL de meio BHI semi-sólido (0,75%) previamente inoculado com 10 µL de uma cultura de 24h das bactérias reveladoras (*Staphylococcus aureus* ATCC 25295, *Escherichia coli* ATCC 18804, *Bacillus cereus* ATCC 19987), ou sobrepostas com 3,5mL de meio Sabouraud semi-sólido (0,75%) previamente inoculado com 20 µL de uma cultura de 48h de leveduras reveladoras (*Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 298 e *C. tropicalis* ATCC 750). Após 24h de incubação a 37°C (bactérias reveladoras) ou 48h a 28°C (leveduras reveladoras), a atividade antagonista foi determinada através da presença de halo de inibição de crescimento em torno dos spots. O experimento foi realizado em duplicata (Gomes et al. 2006 com modificações).

##### **4.5.1.2 Fungos Filamentosos**

Fragmentos de 1cm<sup>2</sup> removido das bordas de colônias crescidas por 7 dias em agar Sabouraud dos fungos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium oxalicum* foram inoculados no centro da placa de Petri contendo meio agar batata dextrose (BDA) (Himedia, Índia), spots de 5µL dos isolados bacterianos padronizados (D.O: 0,05 a 0,08, leitura a 625nm) depositados a uma distância de 2,5cm do fungo. As placas foram então incubadas a 28°C por 72h e verificadas a cada 12h quanto a presença de halo de inibição de crescimento. O experimento foi realizado em duplicata (Sagahón et al., 2011 com modificações).

#### **4.5.2 Cultivo das bactérias e preparo dos extratos brutos**

As bactérias isoladas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 24h, em seguida foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio BHI líquido e incubados em shaker (110g) a 37°C por 72h. Ao final desse período, as culturas foram centrifugadas a 1.900g por 15min e o sobrenadante utilizado para sucessivas extrações com acetato de etila na razão de 1:1 (v/v). Após adição de 5% de sulfato de sódio anidro, a respectiva fase orgânica foi concentrada em rota vapor a 45°C, e em centrífuga a vácuo “Speed Vac”, sendo ao final do processo solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 20mg/mL, para depósito na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do René Rachou/FIOCRUZ. Estes extratos serão avaliados em ensaios biológicos para estudos de bioprospecção *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e três linhagens de células tumorais (TK-10, MCF-7, UACC-62).

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Isolamento das bactérias**

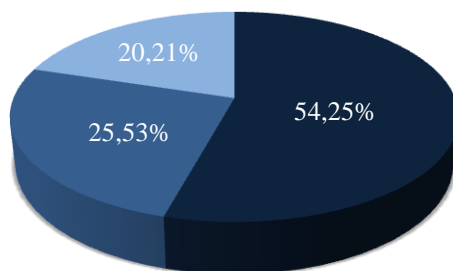
Após o processamento dos cocos de forma a isolar bactérias epifíticas, endofíticas da casca e associadas à polpa, foram obtidos ao todo 94 isolados, que foram selecionados com base nas características macro morfológicas (coloração, tamanho, aspecto da colônia e outras particularidades) visualizadas após um período de incubação de até 72h a 37°C em meio de cultura (Tryptic Soy Agar) 5%. Os morfotipos descritos foram, em seguida, isolados em novas placas contendo meio TSA, obtendo-se, dessa forma, culturas puras (Tabela 1).

Quanto à coloração das colônias, observou-se que 22 eram brancas, 18 amarelas, 8 transparentes, 20 cor creme, 17 beges, 3 vermelhas, 3 laranjas, 2 salmão e 1 marrom. No que diz respeito ao tamanho das colônias observou-se que 38 eram pequenas, 26 médias e 32 grandes, e quanto ao aspecto, foi observada 28 colônias rugosas e 66 lisas.

O código de referência utilizado para esses isolados foi LMA, referindo-se ao Laboratório de Microbiologia Aplicada, local em que todos os experimentos foram realizados. Dos 94 isolados obtidos 51 (54,25%) estavam associados à parte externa da

casca (epicarpo) sendo definidos como epífitas, 19 (20,21%) foram isolados da parte interna da casca dos frutos (endófitos da casca) e 24 (25,53%) isolados estavam associados ao mesocarpo (associados à polpa) (Figura 9).

■ Bactérias epifíticas      ■ Bactérias associadas à polpa  
■ Bactérias associadas à casca



**Figura 9:** Proporção de bactérias isoladas de diferentes partes dos frutos da macaúba.

Os isolados foram ainda caracterizados quanto à reação tintorial de Gram, no qual observou-se que 35 isolados (37,23%) são bacilos Gram-negativos, 20 (21,28%) são bacilos Gram-positivos, 31 (32,98%) são cocos Gram-positivos e apenas 8 (8,51%) são cocos Gram-negativos. Foi possível verificar ainda que 39 (41,49%) dos isolados são cocos, 55 (58,51%) bacilos, 51 (54,26%) Gram positivos e 43 (45,74%) Gram negativos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Descrição das bactérias associadas aos frutos da macaúba, com relação à parte dos frutos de que foram isoladas, reação tintorial de Gram e características macro e micro morfológicas.

<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Características macro morfológicas das colônias</b>	
LMA 01	EC	Bacilo	Negativo	Transparente, média, borda irregular, rugosa
LMA 02	EP	Bacilo	Positivo	Creme, Pequena, Lisa
LMA 03	EP	Bacilo	Negativo	Amarela vibrante, pequena, lisa
LMA 04	AP	Cocos	Negativo	Amarela clara, Pequena, lisa, Bolinha amarela central
LMA 05	EP	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, grande, rugosa, opaca, borda irregular
LMA 06	EP	Bacilo	Positivo	Amarela transparente, média, lisa
LMA 07	AP	Bacilo	Positivo	Bege transparente, Média, Borda transparente
LMA 08	AP	Cocos	Negativo	Transparente, muito pequena, lisa, “nevoa”
LMA 09	EP	Cocos	Negativo	Vermelha, Pequena, Lisa
LMA 10	AP	Bacilo	Negativo	Branca, grande, muito rugosa, opaca, alto relevo
LMA 11	EC	Cocos	Positivo	Creme transparente, pequena, lisa
LMA 12	EC	Bacilo	Positivo	Amarela clara, média, opaca, lisa
LMA 13	EP	Bacilo	Negativo	Bege, grande, rugosa, áspera, borda irregular
LMA 14	EP	Cocos	Positivo	Laranja, média, lisa, borda amarelada
LMA 15	EP	Cocos	Negativo	Bege transparente, grande, opaca, círculos centrais
LMA 16	AP	Bacilo	Positivo	Laranja vibrante, grande, muito rugosa
LMA 17	EP	Bacilo	Negativo	Bege, grande, muito rugosa, borda elevada
LMA 18	EP	Bacilo	Negativo	Transparente, pequena, lisa
LMA 19	AP	Cocos	Positivo	Branca, pequena, lisa
LMA 20	AP	Cocobacilo	Negativo	Creme leitosa, média, lisa
LMA 21	EP	Bacilo	Positivo	Creme, grande, opaca, rugosa, áspera
LMA 22	AP	Bacilo	Positivo	Branca, grande, muito rugosa, opaca, alto relevo
LMA 23	EP	Bacilo	Negativo	Amarela, média, lisa, borda esbranquiçada
LMA 24	EP	Cocos	Positivo	Creme transparente, média, lisa,
LMA 25	EP	Bacilo	Positivo	Amarela Clara, grande e escura no centro, lisa
LMA 26	EP	Bacilo	Negativo	Bege amarelada, grande, rugosa, opaca, borda irregular
LMA 27	EP	Bacilo	Negativo	Amarela transparente, grande, lisa
LMA 28	EP	Bacilo	Negativo	Creme esbranquiçada, pequena, pouco opaca, lisa
LMA 29	AP	Bacilo	Negativo	Branca transparente, pequena, lisa
LMA 30	EP	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, grande, rugosa, opaca, borda irregular

EP – Epífítico; EC – Endofítico da casca; AP - Associados à polpa.

Continuação **tabela 1.**

Código	Origem	Coloração de		Características macro morfológicas das colônias
		Cocos	Gram	
LMA 31	EC	Cocos	Positivo	Branca creme, média, lisa
LMA 32	EP	Bacilo	Negativo	Creme transparente, pequena, lisa
LMA 33	EP	Bacilo	Negativo	Amarela, média, áspera, opaca, umbilicada
LMA 34	EP	Bacilo	Positivo	Creme transparente, pequena, rugosa
LMA 35	EP	Cocos	Positivo	Bege, grande, lisa, Borda branca rajada
LMA 36	EP	Bacilo	Positivo	Vermelha, pequena, rugosa
LMA 37	EP	Cocos	Positivo	Amarela opaca, média, lisa
LMA 38	EP	Bacilo	Positivo	Amarela Clara, grande, escura no centro, rugosa
LMA 39	AP	Cocos	Positivo	Creme, pequena, lisa, borda transparente
LMA 40	EP	Bacilo	Positivo	Creme amarelada, pequena, lisa
LMA 41	EP	Bacilo	Negativo	Branca leitosa, pequena, lisa
LMA 42	EP	Cocos	Positivo	Transparente, pequena, lisa
LMA 43	EP	Cocos	Positivo	Branca amarelada, pequena, lisa
LMA 44	AP	Cocos	Positivo	Amarela, pequena, lisa, bolinha amarela central
LMA 45	AP	Cocos	Positivo	Branca transparente, pequena, lisa
LMA 46	AP	Bacilo	Positivo	Bege, grande, lisa, borda irregular
LMA 47	EP	Bacilo	Positivo	Branca leitosa, pequena, lisa
LMA 48	EP	Bacilo	Positivo	Creme leitosa, média, lisa
LMA 49	AP	Bacilo	Positivo	Branca amarelada, grande, rugosa, opaca
LMA 50	AP	Bacilo	Positivo	Bege, grande, lisa, opaca
LMA 51	AP	Bacilo	Negativo	Bege transparente, média, umbilicada, círculo no centro
LMA 52	EP	Bacilo	Positivo	Branca, grande, rugosa, opaca, “alto relevo”
LMA 53	EC	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, grande, transparente, rugosa, lisa
LMA 54	EP	Cocos	Positivo	Creme amarelada, média, lisa, círculo no centro
LMA 55	EP	Bacilo	Positivo	Salmão, pequena, lisa
LMA 56	AP	Bacilo	Negativo	Transparente, média, borda irregular
LMA 57	AP	Cocos	Positivo	Branca perolada, pequena, lisa
LMA 58	AP	Cocos	Positivo	Branca transparente, pequena, pontinhos branco lisa
LMA 59	EP	Bacilo	Negativo	Amarela, borda transparente, escura no centro, lisa
LMA 60	EP	Cocos	Positivo	Branca leitosa, grande, lisa

EP – Epífítico; EC – Endofítico da casca; AP - Associados à polpa.

Continuação **tabela 1.**

Código	Origem	Coloração de		Características macro morfológicas das colônias
		Bacilo	Gram	
LMA 61	EP	Bacilo	Positivo	Branca, média, lisa, opaca, borda amarelada rajada
LMA 62	EP	Bacilo	Negativo	Marrom transparente, grande, lisa
LMA 63	EP	Cocos	Positivo	Creme, pequena, lisa, borda transparente
LMA 64	AP	Cocos	Positivo	Laranja rose, média, lisa, opaca, borda irregular
LMA 65	AP	Cocos	Positivo	Creme perolada, muito pequena, lisa
LMA 66	EP	Bacilo	Positivo	Amarelada transparente, grande, lisa
LMA 67	EP	Cocos	Positivo	Amarela esbranquiçada, pequena, rajadas, rugosa
LMA 68	AP	Bacilo	Negativo	Bege, grande, muito rugosa, opaca
LMA 69	AP	Cocos	Positivo	Transparente esbranquiçada, pequena, lisa
LMA 70	EC	Bacilo	Positivo	Branca bege, grande, muito rugosa, opaca, “verruga”
LMA 71	EP	Bacilo	Negativo	Creme transparente, muito pequena, lisa
LMA 72	EC	Bacilo	Negativo	Branca, opaca, borda irregular, grande, rugosa
LMA 73	EP	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, grande, lisa, áspera, borda irregular,
LMA 74	EP	Bacilo	Positivo	Creme, muito pequena, lisa
LMA 75	AP	Cocos	Positivo	Creme, pequena, lisa, borda transparente
LMA 76	AP	Cocos	Positivo	Branca creme, média, lisa, borda transparente
LMA 77	AP	Cocos	Positivo	Amarela escura transparente, média, lisa
LMA 78	EP	Cocos	Positivo	Creme leitosa, média, lisa
LMA 79	AP	Bacilo	Negativo	Amarela escura, média, muito áspera, borda irregular
LMA 80	AP	Bacilo	Negativo	Branca, média, lisa, pouco opaca, borda irregular
LMA 81	EP	Bacilo	Negativo	Amarela , grande, lisa
LMA 82	EP	Cocos	Positivo	Bege amarelada, grande, rugosa, áspera, borda irregular
LMA 83	EC	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, grande, opaca, borda branca, rugosa
LMA 84	EP	Cocos	Positivo	Amarela , grande, rugosa, opaca
LMA 85	EP	Cocos	Positivo	Branca leitosa, grande, lisa
LMA 86	AP	Cocos	Positivo	Transparente, muito pequena, pontinhos brancos, lisa
LMA 87	AP	Bacilo	Positivo	Creme transparente, muito pequena, lisa
LMA 88	EC	Bacilo	Positivo	Bege amarelada, média, opaca, lisa
LMA 89	EC	Cocos	Negativo	Vermelha, grande, borda transparente, lisa, “romã”
LMA 90	EP	Bacilo	Negativo	Salmão, pequena, áspera, opaca, rugosa
LMA 91	AP	Bacilo	Positivo	Transparente, muito pequena, lisa “chuvisco”
LMA 92	AP	Cocos	Positivo	Branca cremosa, muito pequena, lisa
LMA 93	EP	Bacilo	Positivo	Branca, pequena, lisa
LMA 94	EP	Cocos	Negativo	Creme, média, lisa, mucosa

EP – Epífítico; EC – Endofítico da casca; AP - Associados à polpa.

## 5.2 Identificação das bactérias baseada em métodos moleculares

As bactérias identificadas até o momento pertencem aos gêneros *Bacillus* (11 isolados), *Pseudomonas* (2 isolados), *Klebsiella* (1 isolado), *Staphylococcus* (1 isolado) e *Kocuria* (1 isolado) (Tabela 2). Esses gêneros são comumente descritos, como microbiota associada a solos e substratos vegetais (Ahemad et al., 2011; Aislim et al., 2002; Cordero et al., 2012; Li et al., 2006; Sarkar et al., 2012).

Após a identificação de todos os isolados de bactérias obtidos dos frutos da macaúba, os dados poderão ser discutidos de forma mais abrangente, melhorando assim, a compreensão da microbiota associada a esta espécie vegetal.

**Tabela 2:** Identificação das bactérias isoladas dos frutos da macaúba por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA.

Código LMA	Origem	Identificação	Query coverage	E-value	Max. Ident
LMA 02	EP	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	0.0	99%
LMA 06	EP	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	0.0	99%
LMA 22	AP	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	0.0	99%
LMA 34	EP	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%	0.0	99%
LMA 50	AP	<i>B. pumilus</i>	100%	0.0	99%
LMA 61	EP	<i>B. pumilus</i>	100%	0.0	98%
LMA66	EP	<i>B. pumilus</i>	100%	0.0	95%
LMA 07	AP	<i>Bacillus</i> sp.	100%	0.0	100%
LMA46	AP	<i>Bacillus</i> sp.	99%	0.0	97%
LMA73	EP	<i>Bacillus</i> sp.	100%	0.0	94%
LMA 21	EP	<i>B. cereus</i>	100%	0.0	99%
LMA30	EP	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	100%	0.0	90%
LMA37	EP	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	100%	0.0	97%
LMA67	EP	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	100%	0.0	96%
LMA70	EC	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	100%	0.0	93%
LMA77	AP	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	100%	0.0	95%
LMA82	EP	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	99%	0.0	92%
LMA 31	EC	<i>Staphylococcus</i> sp.	100%	0.0	94%
LMA65	AP	<i>Staphylococcus</i> sp.	100%	0.0	94%
LMA39	AP	<i>S. epidermidis</i>	100%	0.0	95%
LMA75	AP	<i>S. epidermidis</i>	100%	0.0	94%
LMA60	EP	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	100%	0.0	93%
LMA69	AP	<i>B. paraconglomeratum</i>	100%	0.0	95%
LMA78	EP	<i>B. paraconglomeratum</i>	100%	0.0	94%
LMA 03	EP	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	0.0	98%
LMA 27	EP	<i>Pseudomonas</i> sp.	94%	0.0	98%
LMA20	AP	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%	0.0	97%
LMA 25	EP	<i>Brevibacterium linens</i>	99%	0.0	96%
LMA 43	EP	<i>Kocuria rhizophila</i>	100%	0.0	98%
LMA47	EP	<i>Leucobacter</i> sp.	100%	0.0	94%
LMA48	EP	<i>Brevibacterium linens</i>	100%	0.0	95%
LMA64	AP	<i>Gordonia alkanivorans</i>	100%	0.0	95%
LMA84	EP	<i>Arthrobacter globiformis</i>	99%	0.0	91%

EP – Epífítico; EC – Endofítico da casca; AP - Associados à polpa.

## 5.3 Atividades enzimáticas

### 5.3.1 Amilase

Dos 94 isolados de bactérias testados, 41 (43,62%) apresentaram produção de amilase em meio sólido (Tabela 3). Os índices enzimáticos (I.E) variaram de 1,13 (LMA 72) a 3,5 (LMA 49). Na figura 10 pode-se observar o halo apresentado pelas bactérias ainda não identificadas, LMA72 e LMA81. Os gêneros até então identificados, como produtores de amilase, neste estudo, foram *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Kocuria*. Bactérias pertencentes a estes três gêneros já foram, anteriormente descritas, como produtoras desta enzima. *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, e *B. amyloliquefaciens* foram descritas pela capacidade de produzir  $\alpha$ -amilases termoestáveis, capazes de atender as necessidades industriais (Prakash & Jaiswal, 2010).

Agrawal e colaboradores (2005), utilizando metodologia similar, verificaram que do total de 175 colônias bacterianas isoladas de amostras de solo na Índia, 33 formaram halos de hidrólise, sendo indicativo de produção desta enzima. Estes mesmos autores, verificaram, por meio da indução da produção de amilase, em meio líquido, que a maior produção foi obtida com o isolado do gênero *Bacillus* sp..

Dand e colaboradores, (2009) ao isolar 88 bactérias heterotróficas de sedimentos marinhos, e analisar a produção de enzimas hidrolíticas por esses isolados, verificaram que a maior produção de amilase, foi observada para o isolado do gênero *Pseudomonas* sp. Também duas novas espécies do gênero *Kocuria*: *K. flava* sp. nov. e *K. turfanensis* sp. nov. foram caracterizadas como produtoras de amilase (Zhou et al., 2008)

**Tabela 3:** Atividade de amilase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias obtidos dos frutos da macaúba (*A. aculeata*) em estudo.

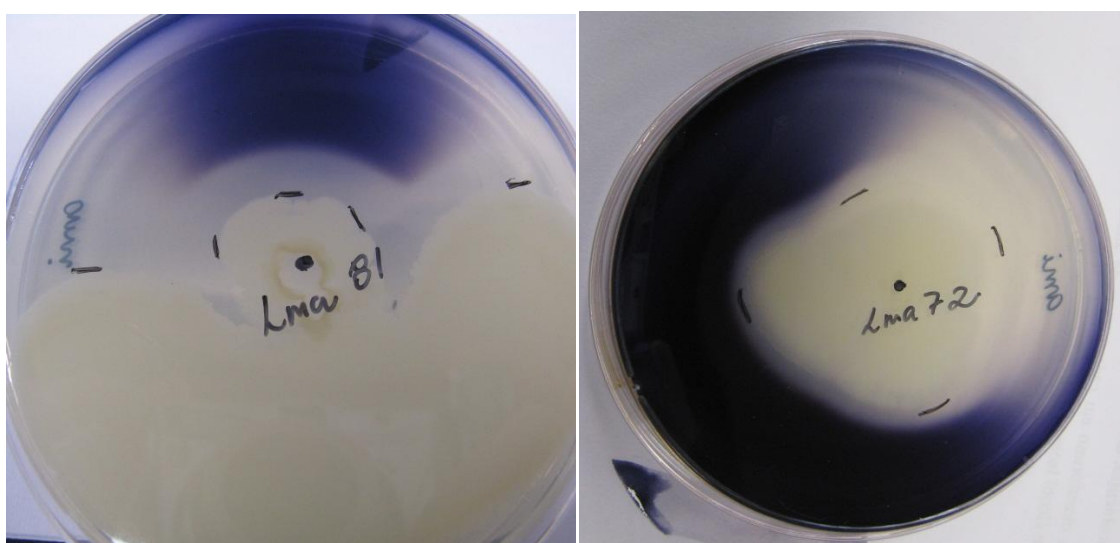
Código/Identificação	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - LMA 02	29,5 ± 0,71	20,5 ± 3,53	1,46 ± 0,21
<i>Pseudomonas stutzeri</i> – LMA 03	17,5 ± 2,12	6 ± 0	2,92 ± 0,35
<i>B. amyloliquefaciens</i> – LMA 06	43,5 ± 0,71	36 ± 1,41	1,21 ± 0,02
LMA10	19,5 ± 0,71	14 ± 0	1,39 ± 1,42
LMA13	37,5 ± 9,19	32,5 ± 7,77	1,15 ± 0
LMA14	18,5 ± 0,71	11 ± 0	1,68 ± 0,06
LMA17	39 ± 9,9	31,5 ± 9,19	1,25 ± 0,04
LMA18	52,5 ± 2,12	46 ± 1,41	1,14 ± 0,01
<i>B. cereus</i> – LMA 21	25 ± 1,41	13 ± 5,65	2,09 ± 0,80
LMA29	31,5 ± 3,54	20,5 ± 4,94	1,56 ± 0,20
LMA30	38 ± 4,24	31,5 ± 3,53	1,21 ± 0
LMA32	35 ± 0	26 ± 1,41	1,35 ± 0,07
LMA33	36 ± 5,66	25,5 ± 7,77	1,45 ± 0,21
<i>B. amyloliquefaciens</i> – LMA 34	33,5 ± 2,12	21 ± 1,41	1,60 ± 0
LMA36	81 ± 0	54,5 ± 0,70	1,49 ± 0,01
LMA38	15 ± 1,41	6,5 ± 0,70	2,33 ± 0,47
LMA41	18 ± 1,41	12,5 ± 2,12	1,45 ± 0,13
LMA42	23 ± 4,24	11 ± 1,41	2,08 ± 0,11
<i>Kocuria rhizophila</i> – LMA 43	14 ± 1,41	9 ± 0	1,56 ± 0,15
LMA49	45,5 ± 2,12	13 ± 0	3,5 ± 0,16
<i>B. pumilus</i> – LMA 50	25,5 ± 2,12	21 ± 1,41	1,21 ± 0,01
LMA52	31 ± 12,7	23 ± 8,48	1,34 ± 0,06
LMA54	32 ± 2,83	17 ± 1,41	1,88 ± 0
LMA55	34 ± 0	26,5 ± 4,94	1,31 ± 0,24
LMA57	29,5 ± 0,71	21,5 ± 4,94	1,41 ± 0,29
LMA59	20,5 ± 0,71	10 ± 0	2,05 ± 0,07
LMA60	19,5 ± 0,71	8,5 ± 0,70	2,30 ± 0,10
<i>B.pumilus</i> – LMA 61	34 ± 1,41	11 ± 1,41	3,11 ± 0,27
LMA 63	12,5 ± 0,71	5 ± 0	2,50 ± 0,14
LMA 64	26,5 ± 0,71	14,5 ± 2,12	1,84 ± 0,22
LMA 68	60 ± 0	46 ± 5,65	1,31 ± 0,16
LMA 69	15,5 ± 0,71	7,5 ± 0,70	2,08 ± 0,29
LMA 71	16 ± 1,41	9 ± 1,41	1,79 ± 0,12
LMA 72	49 ± 5,66	43,5 ± 6,36	1,13 ± 0,03
LMA 73	29 ± 1,41	20 ± 2,82	1,46 ± 0,13
LMA 78	41 ± 1,41	34,5 ± 2,12	1,19 ± 0,03
LMA 79	26 ± 1,41	16 ± 1,41	1,63 ± 0,05

Continuação **tabela 3.**

Código	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
LMA 81	56 ± 1,41	47 ± 0	1,19 ± 0,03
LMA 83	12,5 ± 0,71	10 ± 0	1,25 ± 0,07
LMA 85	16 ± 1,41	6 ± 0	2,67 ± 0,23
LMA 90	16 ± 1,41	8 ± 1,41	2,02 ± 0,17

<sup>1/</sup> Índice enzimático expresso pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (D<sub>H</sub>) e o diâmetro da colônia de células (D<sub>C</sub>) dos isolados de bactérias em estudo.

<sup>2/</sup> Valor da média seguido do valor do desvio padrão.



**Figura 10:** Isolados que apresentaram produção de amilase, revelação realizada com iodo 0,1%.

### 5.3.2 Lipases

Dos 94 isolados analisados, 9 (9,57%), apresentaram atividade de lipase, os índices enzimáticos variaram de 1,23 (LMA 12) a 2,1 (LMA 39). O percentual de isolados produtores de lipase em trabalhos de prospecção varia em função do habitat em estudo. Willerding et al., (2011) testando a capacidade de produção de lipases, por bactérias isoladas de solo e raízes de ambiente agrícola e florestal na Amazônia, verificaram que dos 181 isolados, 75 (41,44%) foram produtores da enzima em meio sólido contendo óleo de oliva. No entanto, Lee et al., (2009) isolando bactérias de ambientes marinhos de regiões tropicais, verificaram que apenas 9 (18%) isolados,

apresentaram atividade de lipase, sendo *Vibrio* e *Staphylococcus*, os gêneros produtores mais comuns.

O isolado, até o momento identificado neste estudo como produtor de lipase pertence ao gênero *Staphylococcus*, bactéria conhecidamente produtora de lipase (Lee et al., 2009). Ghasemi et al., (2011), isolando bactérias com atividade de lipase de um lago salgado no Iran verificaram que um dos isolados obtidos apresentava similaridade de 99-100% com o gênero *Staphylococcus*, por meio do sequenciamento do gene 16rRNA.

**Tabela 4:** Atividade de lipase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo.

Código/Identificação	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
LMA11	11 ± 0	8 ± 0	1,37 ± 0
LMA12	10,5 ± 0,70	8,5 ± 0,70	1,23 ± 0,01
LMA15	10,5 ± 0,70	7 ± 0	1,5 ± 0,10
LMA16	10,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	1,61 ± 0,06
LMA19	10,5 ± 0,70	7 ± 0	1,5 ± 0,10
LMA24	9,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	1,46 ± 0,05
LMA25	10 ± 0	6,5 ± 0,70	1,54 ± 0,16
<i>Staphylococcus</i> sp. – LMA 31	10 ± 0	7 ± 0	1,42 ± 0
LMA39	10,5 ± 0,70	5 ± 0	2,1 ± 0,14

<sup>1/</sup> Índice enzimático expresso pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (D<sub>H</sub>) e o diâmetro da colônia de células (D<sub>C</sub>) dos isolados de bactérias em estudo.

<sup>2/</sup> Valor da média seguido do valor do desvio padrão.

### 5.3.3 Celulases

A produção de celulase foi observada para 26 (27,66%) dos 94 isolados testados. Os valores de índice enzimático (I.E) variaram de 1,07 (LMA 55) a 2,68 (LMA 01). Na figura 11 pode ser observado o halo de hidrólise em torno da colônia do isolado LMA 58, após a adição de vermelho congo. Os isolados identificados até o momento, que apresentaram produção de celulases, pertencem ao gênero *Bacillus*.

Singh & colaboradores (2004) isolando bactérias do solo verificaram que *B. sphaericus*, apresentou maior produtividade de celulase, dentre os isolados testados.

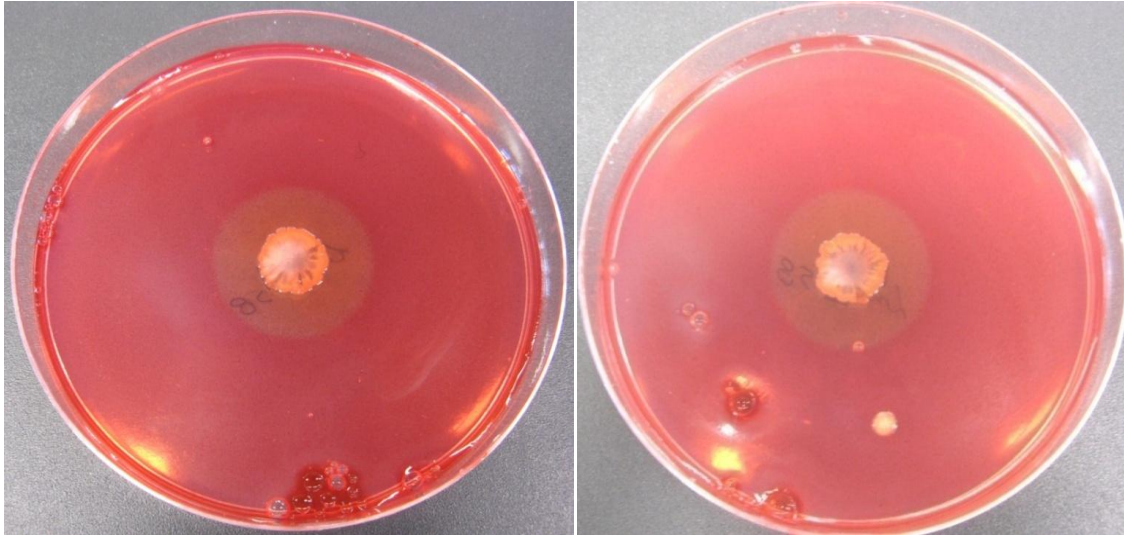
Singh & Kaur (2012) isolando bactérias de solo e madeira em decomposição, obtiveram 30 isolados que apresentaram zonas de hidrólise ao redor da colônia, após a adição de vermelho congo em meio carboximetilcelulose (CMC) agar. Os mesmos autores realizaram posteriormente ensaios quantitativos, e verificaram que o isolado com atividade mais elevada de celulase era *Bacillus* sp., que foi identificado a partir de caracterização morfológica e bioquímica.

**Tabela 5:** Atividade de celulase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo.

Código/Identificação	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
LMA01	21,5 ± 0,70	8 ± 0	2,68 ± 0,09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LMA 02	53 ± 14,14	47,5 ± 13,43	1,12 ± 0,02
LMA04	11 ± 0	7,5 ± 0,70	1,47 ± 0,14
LMA11	26 ± 0	18 ± 0	1,44 ± 0
LMA13	54 ± 4,24	45 ± 7,07	1,21 ± 0,09
LMA18	32,5 ± 2,12	22 ± 2,82	1,49 ± 0,29
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LMA 22	34 ± 1,41	22 ± 0	1,54 ± 0,06
LMA29	22 ± 0	9,5 ± 0,70	2,32 ± 0,17
LMA36	31 ± 1,41	18,5 ± 0,70	1,68 ± 0,14
LMA39	23 ± 0	19 ± 0	1,21 ± 0
LMA48	19 ± 1,41	11,5 ± 0,70	1,65 ± 0,02
LMA49	17 ± 0	14,5 ± 0,70	1,17 ± 0,06
<i>Bacillus pumilus</i> LMA 50	20 ± 2,82	12 ± 0	1,66 ± 0,23
LMA51	23 ± 1,41	13,5 ± 2,12	1,71 ± 0,16
LMA55	51,5 ± 0,70	48 ± 1,41	1,07 ± 0,01
LMA56	10 ± 0	7,5 ± 0,70	1,34 ± 0,13
LMA57	23 ± 2,82	17,5 ± 2,12	1,33 ± 0,32
LMA58	21 ± 0	11 ± 0	1,9 ± 0
<i>Bacillus pumilus</i> LMA 61	28,5 ± 2,12	12 ± 0	2,37 ± 0,18
LMA 63	21 ± 0	10 ± 0	2,1 ± 0
LMA 66	28 ± 0	12,5 ± 2,12	2,27 ± 0,38
LMA 68	23 ± 2,82	11 ± 0	2,09 ± 0,26
LMA 70	15 ± 0	11 ± 0	1,36 ± 0
LMA 71	18 ± 0	7,5 ± 0,70	2,41 ± 0,23
LMA 78	30±1,41	22±1,41	1,36±0,02
LMA 80	28,5±2,12	16±1,41	1,78±0,02

<sup>1/</sup> Índice enzimático expresso pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (D<sub>H</sub>) e o diâmetro da colônia de células (D<sub>C</sub>) dos isolados de bactérias em estudo.

<sup>2/</sup> Valor da média seguido do valor do desvio padrão.



**Figura 11:** Isolado LMA 58 (duplicata) que apresentou atividade de celulase, revelação realizada com solução de vermelho congo 0,05%.

#### 5.3.4 Xilanases

Nenhum dos 94 isolados de bactérias testados, apresentou produção de xilanases. No entanto, existem relatos da produção de xilanases por bactérias pertencentes aos mesmos gêneros que foram identificados no presente estudo, tais como, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Kocuria*.

Heck e colaboradores, (2002), utilizando metodologia semelhante, verificaram a produção de xilanase por *Bacillus subtilis*, isolado de solo e água da região amazônica.

Krishna e colaboradores, (2008) isolaram de resíduos de bauxita, uma estirpe produtora de xilanase capaz de atuar em uma ampla faixa de temperatura (30°C-85°C) e pH (4,5-9). O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que a estirpe pertence ao gênero *Kocuria*. Mais recentemente, a otimização da produção de xilanases por *Pseudomonas* sp., isolada de amostras de solo, foi descrita com a indicação da combinação de 30°C de temperatura, pH 7,0, concentração do substrato de 1% e tamanho do inóculo de 6% (Sharma & Chand, 2012).

No presente trabalho, nenhum isolado de bactéria obtido dos frutos da macaúba, apresentou atividade de xilanase, no entanto, fatores como, temperatura, pH e nutrientes podem afetar a produção enzimática por esses micro-organismos, desta forma,

alterações nas condições de cultivo podem induzir a produção e atividade de xilanases por esses micro-organismos.

### 5.3.5 Proteases

A produção de proteases, observada através da hidrólise de caseína presente no meio, foi positiva para 30 (31,91%) dos isolados testados. Os valores de índice enzimático (I.E) variaram de 1,1 (LMA 57) a 3,08 (LMA 70). Na figura 12 é possível observar o halo de hidrólise apresentado por alguns dos isolados de bactérias testados, indicativo da produção de proteases.

Os isolados que apresentaram atividade de protease pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Membros do gênero *Bacillus*, são geralmente encontrados no solo, e apresentam atividade proteolítica. Além da importância no uso industrial, as proteases produzidas por esses micro-organismos desempenham importante função na ciclagem de nitrogênio, contribuindo para a fertilidade do solo, uma vez que, boa parte das fontes de nitrogênio está na forma de N proteico, o qual é liberado e disponibilizado para as plantas por meio da ação de proteases e desaminases, seguida da atividade de micro-organismos nitrificantes, uma vez que as plantas só absorvem N na forma de nitrato (Aslim et al, 2002).

Sevinc & Demirkan, (2011) avaliando a atividade proteolítica de bactérias isoladas do solo, utilizando agar caseína e agar *skin milk*, verificaram que todos os 54 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* testados, apresentaram produção de protease.

Também isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* já foram previamente descritos na literatura como produtores de proteases. Yadav et al., (2010) isolaram de amostras de água, linhagens de *P. aeruginosa* produtora de protease em agar caseína. Linhagens de *P. fluorescens* produtoras de metaloprotease extracelular foram isolados de amostras de leite (Pinto et al., 2010).

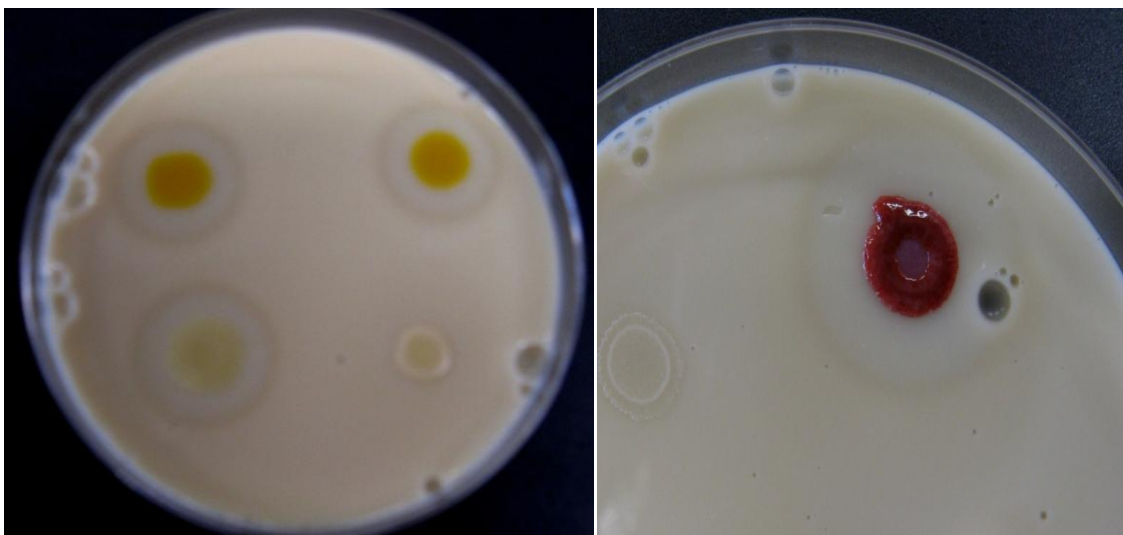
Rodarte & colaboradores, (2011), avaliando a atividade proteolítica de bactérias isoladas de grãos de café (*Coffea arabica L*), observaram que (21) 52,5% dos isolados bacterianos foram positivos para secreção de protease em agar caseína, demonstrando assim, o potencial que as bactérias apresentam para a produção da referida enzima.

**Tabela 6:** Atividade de protease, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo.

<b>Código/Identificação</b>	<b>Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)</b>	<b>Diâmetro da colônia (Dc) (mm)</b>	<b>Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup></b>
<i>Bacillus cereus</i> – LMA 21	44,5 ± 3,53	28 ± 0	1,59 ± 0,13
<i>Pseudomonas sp.</i> - LMA 27	28,5 ± 0,70	14,5 ± 0,70	1,97 ± 0,05
LMA32	29,5 ± 0,70	16 ± 0	1,84 ± 0,04
LMA44	14 ± 0	6,5 ± 0,70	2,17 ± 0,23
LMA49	17,5 ± 2,12	13,5 ± 2,12	1,3 ± 0,05
<i>Bacillus pumilus</i> – LMA 50	15,5 ± 0,70	12 ± 1,41	1,3 ± 0,09
LMA51	14 ± 0	9 ± 1,41	1,58 ± 0,25
LMA52	25 ± 5,65	20 ± 7,07	1,28 ± 0,17
LMA54	14 ± 0	8 ± 0	1,75 ± 0
LMA55	23,5 ± 3,53	20 ± 2,82	1,17 ± 0,01
LMA57	32 ± 14,14	29,5 ± 14,84	1,1 ± 0,08
LMA58	18,5 ± 0,70	8 ± 4,24	2,66 ± 1,32
LMA59	13 ± 1,41	8,5 ± 0,70	1,53 ± 0,04
<i>Bacillus pumilus</i> - LMA 61	18 ± 0	6,5 ± 0,70	2,79 ± 0,30
LMA 65	11 ± 0	7 ± 0	1,57 ± 0
LMA 66	21 ± 0	10 ± 0	2,1 ± 0
LMA 67	10,5 ± 0,70	7,5 ± 0,70	1,4 ± 0,04
LMA 68	28,5 ± 2,12	20 ± 1,41	1,42 ± 0
LMA 70	21 ± 1,41	7 ± 1,41	3,08 ± 0,82
LMA 72	30,5 ± 0,70	25 ± 0	1,22 ± 0,03
LMA 73	20,5 ± 0,70	11,5 ± 0,70	1,78 ± 0,05
LMA 75	19,5 ± 0,70	10 ± 0	1,95 ± 0,07
LMA 76	20,5 ± 2,12	9 ± 1,41	2,33 ± 0,60
LMA 78	34,5 ± 7,77	27 ± 4,24	1,27 ± 0,08
LMA 79	19,5 ± 2,12	11,5 ± 2,12	1,71 ± 0,13
LMA 81	30 ± 0	21 ± 0	1,43 ± 0
LMA 84	11,5 ± 0,70	8,5 ± 0,70	1,35 ± 0,03
LMA 85	11 ± 0	6,5 ± 0,70	1,7 ± 0,18
LMA 89	19,5 ± 3,53	10 ± 0	1,95 ± 0,35
LMA 93	6 ± 0	4 ± 0	1,5 ± 0

<sup>1/</sup> Índice enzimático expresso pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (D<sub>H</sub>) e o diâmetro da colônia de células (D<sub>C</sub>) dos isolados de bactérias em estudo.

<sup>2/</sup> Valor da média seguido do valor do desvio padrão.



**Figura 12:** Isolados que apresentaram produção de protease.

### 5.3.6 Pectinases

Neste estudo, 50 isolados (53,19%) foram produtores de pectinase. Os valores de índice enzimático (I.E) variaram de 1,27 (*Bacillus* sp.) a 4,43 (LMA 72). Na figura 13 é possível observar o halo de hidrólise provocado pela produção de pectinase dos isolados LMA 56, LMA 41 e do isolado LMA 22 identificado como *Bacillus amyloliquefaciens*.

Os isolados produtores de pectinase, já identificados pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Klebsiella*.

Diferentes isolados de *Bacillus* sp, *B. subtilis*, *B. polymixa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens* e *P. marginalis* produtores de pectinases já foram descritos (Uenojo & Pastore, 2007).

Genari, (1999) descreveu a produção de pectinase em meio líquido contendo pectina cítrica como única fonte de carbono por *Klebsiella oxytoca* isolada do interior de frutos de *Coffea arábica*.

Tem sido sugerido que estas enzimas contribuem para a penetração de bactérias nos tecidos vegetais. Quando sementes de trigo foram inoculadas com *Klebsiella oxytoca*, os níveis de produção de pectinase aumentaram, sugerindo a maior taxa de colonização interna e, além disso, ocorreu maior produção de biomassa no trigo, surgindo a hipótese de fixação de N<sub>2</sub>, ou produção de fatores de crescimento por *K. oxytoca* (Kovtunovych et al., 1999).

**Tabela 7:** Atividade de pectinase, expressa pelo índice enzimático (IE) dos isolados de bactérias em estudo.

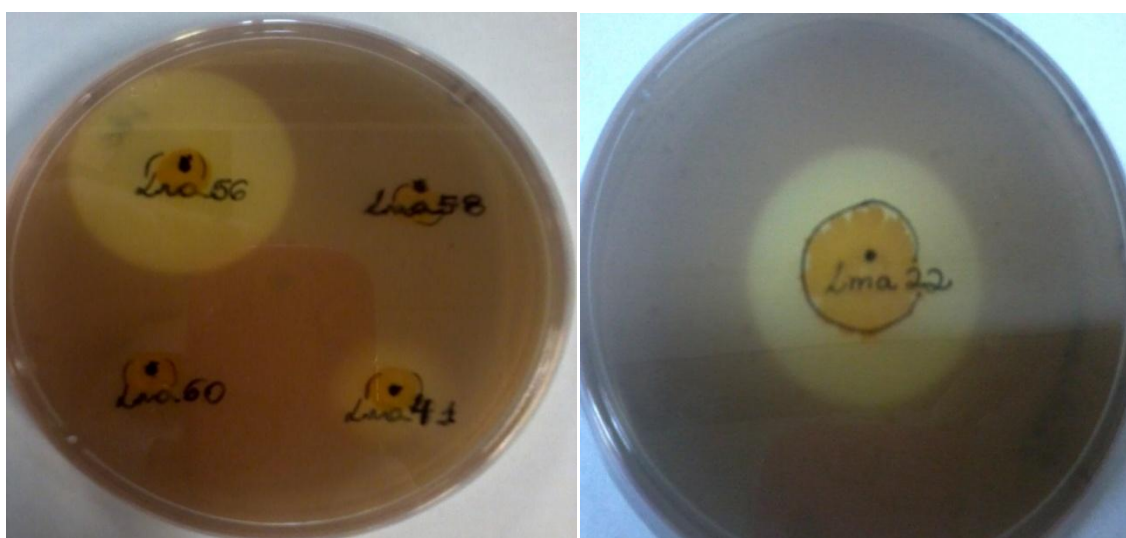
Código/Identificação	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
LMA01	32,5 ± 2,12	17 ± 2,83	1,93 ± 0,20
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 02	18 ± 7,07	7 ± 0	2,57 ± 1,01
<i>Pseudomonas stutzeri</i> – LMA 03	12 ± 0	7 ± 0	1,71 ± 0
LMA04	36,5 ± 0,70	27,5 ± 2,12	1,33 ± 0,13
LMA05	33,5 ± 0,70	23,5 ± 0,70	1,43 ± 0,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 06	30 ± 0	21 ± 0	1,43 ± 0
<i>Bacillus sp</i> – LMA 07	38 ± 4,24	30 ± 4,24	1,27 ± 0,04
LMA08	31,5 ± 2,12	22,5 ± 4,95	1,42 ± 0,22
LMA09	20,5 ± 10,60	13 ± 8,48	1,67 ± 0,27
LMA10	26 ± 1,41	16,5 ± 0,70	1,58 ± 0,15
LMA11	27,5 ± 3,53	13 ± 8,48	2,58 ± 1,41
LMA12	14,5 ± 2,12	8 ± 1,41	1,82 ± 0,06
LMA13	33,5 ± 0,70	17,5 ± 2,12	1,93 ± 0,19
LMA14	12,5 ± 0,70	7 ± 0	1,79 ± 0,10
LMA15	9,5 ± 0,70	7 ± 0	1,36 ± 0,10
LMA16	15 ± 0	9 ± 0	1,67 ± 0
LMA17	13,5 ± 0,70	9 ± 0	1,5 ± 0,08
<i>Klebsiella oxytoca</i> – LMA 20	13,5 ± 2,12	9,5 ± 0,70	1,43 ± 0,33
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 22	36 ± 1,41	22,5 ± 6,36	1,66 ± 0,41
LMA24	13 ± 0	9,5 ± 0,70	1,37 ± 0,10
LMA26	19 ± 0	10 ± 0	1,9 ± 0
<i>Pseudomonas sp</i> – LMA 27	11 ± 1,41	6,5 ± 0,70	1,69 ± 0,03
LMA28	14 ± 0	6,5 ± 0,70	2,17 ± 0,24
LMA29	11,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	1,77 ± 0,08
LMA30	34 ± 0	14 ± 1,41	2,44 ± 0,25
LMA32	9,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	1,46 ± 0,05
LMA33	34 ± 0	21 ± 0	1,62 ± 0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 34	33 ± 0	25 ± 1,41	1,32 ± 0,7
LMA38	10,5 ± 0,70	5,5 ± 0,70	1,93 ± 0,38
LMA40	11 ± 0	6,5 ± 0,70	1,7 ± 0,19
LMA41	15 ± 0	7,5 ± 0,70	2,01 ± 0,19
LMA48	16 ± 1,41	6,5 ± 0,70	2,46 ± 0,05
LMA52	30 ± 1,41	13 ± 7,07	2,67 ± 1,35
LMA56	33,5 ± 0,70	8,5 ± 0,70	3,95 ± 0,25
LMA57	11 ± 0	8 ± 1,41	1,4 ± 0,25
LMA 63	11,5 ± 0,70	6 ± 0	1,92 ± 0,12
LMA 68	32 ± 0	7,5 ± 0,70	4,29 ± 0,40
LMA 69	9 ± 0	5,5 ± 0,70	1,65 ± 0,21
LMA 70	33 ± 0	10,5 ± 2,12	3,21 ± 0,65

Continuação **tabela 7.**

Código	Diâmetro do halo de hidrólise (DH) (mm)	Diâmetro da colônia (Dc) (mm)	Índice enzimático (IE) DH/DC <sup>1/</sup>
LMA 71	9,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	1,46 ± 0,05
LMA 72	31 ± 0	7 ± 0	4,43 ± 0
LMA 73	23 ± 1,41	8 ± 0	2,88 ± 0,18
LMA 74	20 ± 7,07	5,5 ± 0,70	3,75 ± 1,77
LMA 75	15,5 ± 0,70	6 ± 0	2,58 ± 0,12
LMA 76	12 ± 0	5 ± 0	2,4 ± 0
LMA 78	12 ± 1,41	7 ± 0	1,71 ± 0,20
LMA 79	22 ± 0	7 ± 0	3,14 ± 0
LMA 81	33 ± 0	21 ± 0	1,57 ± 0
LMA 84	12,5 ± 0,70	6 ± 0	2,08 ± 0,12
LMA 88	15 ± 0	6,5 ± 0,70	2,32 ± 0,25

<sup>1/</sup> Índice enzimático expresso pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise (D<sub>H</sub>) e o diâmetro da colônia de células (D<sub>C</sub>) dos isolados de leveduras em estudo.

<sup>2/</sup> Valor da média seguido do valor do desvio padrão.



**Figura 13:** Isolados que apresentaram produção de pectinase, revelação realizada com iodo sublimado.

O presente trabalho demonstra a influencia que as bactérias associadas aos frutos da macaúba (*A. aculeata*) podem desempenhar na deterioração dos frutos, e consequentemente na diminuição da qualidade do óleo, importante para produção de biodiesel, por meio da produção das exoenzimas amilase, lipase, celulase, pectinase,

protease e xilanase. Dessa forma, o conhecimento da microbiota associada aos frutos da macaúba pode permitir o planejamento adequado do manejo da espécie nos momentos da colheita, armazenamento e utilização desses frutos, melhorando a qualidade do produto final de interesse, o óleo para produção de biodiesel. Além disso, as bactérias isoladas apresentam potencial para uso biotecnológico, uma vez que as enzimas produzidas por esses micro-organismos são amplamente empregadas nas indústrias têxtil, farmacêutica, alimentícia, de detergentes, papel, dentre outros.

Por meio da identificação de todas as bactérias isoladas dos frutos da macaúba, correlações poderão ser realizadas entre os resultados obtidos neste estudo, e demais trabalhos similares relatados na literatura, aumentando assim, a compreensão do potencial desempenhado por essa microbiota na produção de hidrolases de interesse industrial.

#### **5.4 Atividade antimicrobiana**

Dos 94 isolados bacterianos testados quanto à produção de substâncias bioativas, 23 (24,47%) foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos um dos micro-organismos alvo (Tabela 9). Na figura 14 é possível observar a atividade antagonista de bactérias isoladas da macaúba (*A. aculeata*) contra bactérias e leveduras de interesse médico.

Dentre os isolados produtores de substâncias bioativas, 21 (22,3%) apresentaram atividade antagonista contra *B. cereus*, micro-organismo de importância epidemiológica como agente de intoxicação alimentar (Mendes et al., 2011; Salustiano et al., 2010). 14 (14,9%) foram ativos contra *S. aureus*, patógeno que expressa uma variedade de fatores de virulência, que medeiam a colonização, invasão e disseminação nos tecidos do hospedeiro (Jiménez et al., 2011). Dentre as patologias causadas por *S. aureus*, destacam-se, a síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada, pneumonia e endocardite (Azevedo et al., 2009; Jiménez et al., 2011; Lamaita et al., 2005; Oviedo, 2006).

Foi verificada ainda, atividade antibacteriana de 12 (12,8%) isolados contra *E. coli*; que apesar de integrante da microbiota intestinal normal, apresenta sorotipos associados a enterites graves (Margall et al., 1997). Além disso, *E. coli* é o agente etiológico mais frequente das infecções do trato urinário (Esparis et al., 2006).

Os isolados bacterianos, que apresentaram atividade antagonista contra bactérias e leveduras patogênicas, pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Espécies de *Bacillus* apresentam uma ampla variedade de substâncias antimicrobianas, sabidamente ativas contra fungos, vírus, micoplasmas e amebas (Yilmaz et al., 2006).

Yilmaz e colaboradores, (2006) verificaram a atividade antimicrobiana, por meio do método de difusão em agar, de 29 linhagens de *Bacillus* spp. isolados de solo. Cinco isolados apresentaram atividade antagonista contra pelo menos uma das bactérias patogênicas testadas, dentre as quais destacam-se *S. aureus*, *B. cereus* e *Micrococcus flavus*.

No presente trabalho, *B. pumilus* apresentou atividade antagonista contra as três bactérias de interesse médico testadas (*S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus*). Mas os isolados já identificados como pertencentes a espécie *B. amyloliquefaciens*, apresentaram perfis de atividade antagonista diferenciados. O isolado LMA 02 apresentou atividade contra as três espécies de *Candida*, *S. aureus* e *B. cereus*, no entanto, não foi ativo contra *E. coli*. LMA 22 apresentou atividade antagonista contra *C. krusei*, *C. tropicalis*, *E. coli* e *B. cereus*, contudo, o isolado não demonstrou atividade contra *S. aureus* e *C. albicans*, já o isolado LMA 34 não apresentou atividade contra as 3 espécies de *Candida*, embora tenha sido ativo para as 3 espécies de bactérias alvo (Tabela 8). Os dados sugerem que estes isolados constituem diferentes cepas, necessitando de testes complementares para sua confirmação, como um fingerprinting com marcador molecular.

No estudo realizado por Aislim e colaboradores, (2002), diferentes cepas de *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* e *B. pumilus*, isolados do solo, apresentaram diferentes perfis de atividade antimicrobiana, através do método de difusão em agar, contra *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus* e *M. flavus*.

Por sua vez, isolados do gênero *Pseudomonas* produtores de substâncias bioativas já foram descritos (Costa et al., 2006). De 142 isolados da rizosfera de 2 cultivares de milho avaliados quanto a atividade antagonista *in vitro*, contra duas cepas da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*, 40 apresentaram atividade para *R. solanacearum* B3B e 26 foram ativas contra *R. solanacearum* 1609.

Leveduras do gênero *Candida*, frequentemente comensais em humanos, em situações relacionadas à queda de imunidade ou debilidade orgânica, podem causar

infecções conhecidas como candidíases ou candidoses em diversos sítios anatômicos (Rörig et al. 2009; Serracarbassa & Dotto, 2003). Infecções na cavidade bucal, infecções sistêmicas, endoftalmite, vulvovaginite e endocardite, são algumas das infecções causadas por essas leveduras (Buluc et al. 2005; Corrêa et al. 2009; Levy et al. 2006; McCullough, 1996; Serracarbassa & Dotto, 2003).

Dos 94 isolados bacterianos testados, 7 (7,5%) apresentaram atividade antagonista contra *Candida albicans*, 9 (9,6%) contra *C. krusei* e 8 (8,5%) contra *C. tropicalis*. Na figura 15 é possível observar alguns isolados de bactérias da macaúba que apresentaram atividade antagonista contra as três espécies de *Candida* testadas. Os isolados já identificados que apresentaram atividade antagonista pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Linhagens de *Pseudomonas* produtoras de substâncias inibitórias contra *Candida* já foram descritas (Harrison et al., 1991; Hassanein et al., 2009). Uma família de peptídios denominados pseudomicina, com atividade contra *C. albicans* foi isolada de culturas líquidas de *P. syringae*, espécie frequentemente associada a plantas (Harrison et al., 1991).

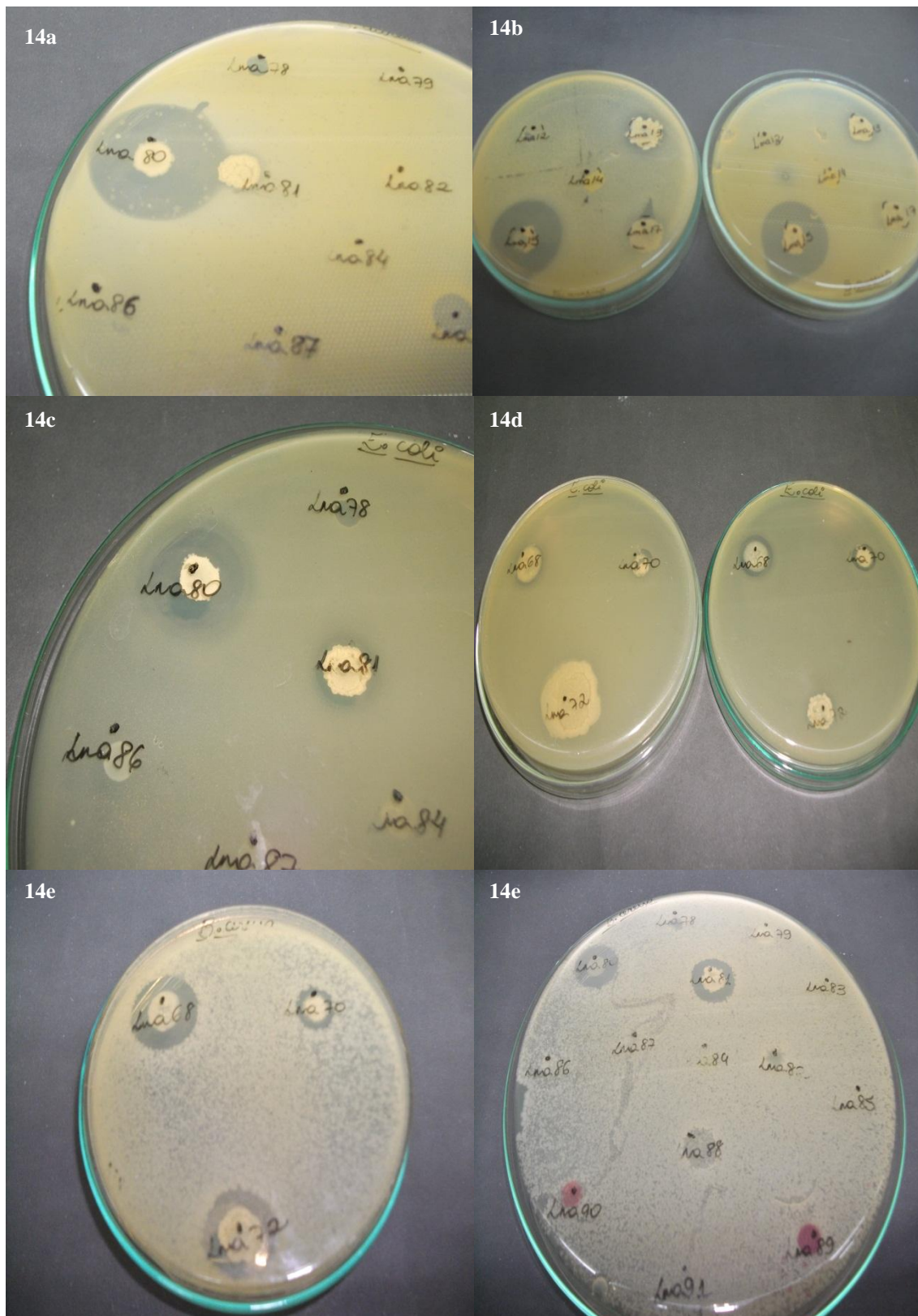
Nenhum dos isolados testados apresentaram atividade para *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium oxalicum*. No entanto, alguns autores relatam a atividade de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* contra o fungo fitopatógeno causador do bolor azul da maçã pertencente ao gênero *Penicillium*, e ainda, fitopatógenos do ginseng e da lentilha pertencentes ao gênero *Fusarium* (Cho et al., 2007; Etebarian et al., 2005; Hassan & Gowen, 2006).

Considerando o potencial antimicrobiano apresentado pelas bactérias associadas aos frutos da macaúba, mais estudos serão conduzidos visando o isolamento e caracterização de substâncias bioativas desses isolados. Nos estudos poderão ser incluídos, ainda, patógenos de importância para a cultura de palmeiras. Como o cultivo comercial da macaúba, ainda, não é representativo no país, a cultura não apresenta doenças microbianas características de grande relevância. Mas sabe-se que os frutos coletados no solo sofrem o ataque de micro-organismos deteriorantes. Assim, os dados obtidos neste estudo sugere o papel da microbiota associada aos frutos da macaúba no possível controle de patógenos e o potencial uso como fonte de novas substâncias bioativas.

**Tabela 8:** Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba (*A. aculeata*), contra bactérias, leveduras, fungos de importância médica e um fitopatógeno.

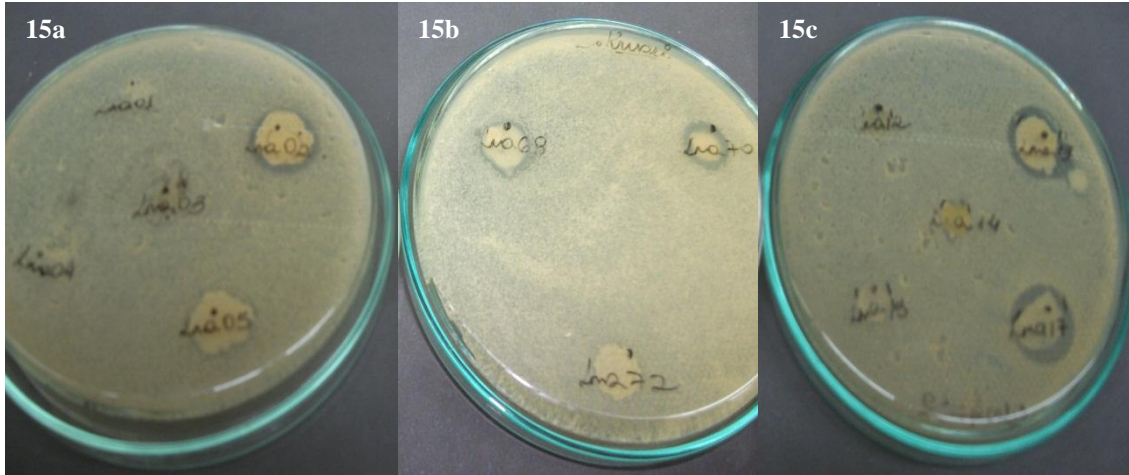
Código	Origem	S.A <sup>1</sup>	E.C <sup>2</sup>	B.C <sup>3</sup>	C.A <sup>4</sup>	C.K <sup>5</sup>	C.T <sup>6</sup>	A.F <sup>7</sup>	F.S <sup>8</sup>	P.O <sup>9</sup>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 02	EP	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> – LMA 03	EP	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>Lma 05</b>	EP	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>Lma 13</b>	EP	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<b>Lma 15</b>	EP	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 17</b>	EP	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 22	AP	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<b>Lma 29</b>	AP	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 30</b>	EP	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 33</b>	EP	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> – LMA 34	EP	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 48</b>	EP	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 49</b>	AP	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> – LMA 50	AP	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 51</b>	AP	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 52</b>	EP	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>Lma 68</b>	AP	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Lma 70</b>	EC	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Lma 72</b>	EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 80</b>	AP	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 81</b>	EP	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<b>Lma 88</b>	EC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lma 91</b>	AP	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = Presença de halo de inibição; (-) = Ausência de halo de inibição; 1-S.A= *Staphylococcus aureus*; 2-E.C= *Escherichia coli*; 3- B.C= *Bacillus cereus*; 4-C.A= *Candida albicans*; 5-C.K= *Candida krusei*; 6-C.T= *Candida tropicalis*; 7-A.F= *Aspergillus fumigatus*; 8-F.S= *Fusarium solani*; 9-P.O= *Penicillium oxalicum*. EP – Epífítico; EC – Endofítico da casca; AP - Associados à polpa.



**Figura 14: Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba contra bactérias de interesse médico; a) Atividade de LMA 80 contra *S. aureus*; b) Atividade de LMA 15 contra *S. aureus*; c) Atividade de LMA 80 contra *E. coli*; d)**

Atividade de LMA 68 e LMA 70 contra *E. coli*; e) Atividade de LMA 68, LMA 70 e LMA 72 contra *B. cereus*; f) Atividade de LMA 80 e LMA 81 contra *B. cereus*.



**Figura 15: Atividade antagônica de bactérias isoladas dos frutos da macaúba contra espécies de *Candida*; a) Atividade de LMA 02 contra *C. albicans*; b) Atividade de LMA 68 e LMA 70 contra *C. krusei*; c) Atividade de LMA 13 e LMA 17 contra *C. tropicalis*.**

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho oferece uma contribuição no que diz respeito ao conhecimento de bactérias associadas aos frutos da macaúba, seu potencial de produção de exoenzimas hidrolíticas e substâncias bioativas fornecendo subsídios para futuros estudos complementares. Através dos experimentos realizados neste trabalho, é possível concluir que:

- As bactérias isoladas dos frutos da macaúba com diferentes períodos de deposição no solo pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* e *Kocuria* comumente associados a solos e substratos vegetais;
- As bactérias isoladas dos frutos da macaúba apresentam potencial quanto à produção das exoenzimas amilase, lipase, protease, pectinase e celulase que podem estar associadas à deterioração dos frutos e diminuição da qualidade do óleo utilizado para produção de biodiesel, e apresentam potencial de aplicação em diversos setores industriais;
- Isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* apresentam atividade antagonista contra bactérias (*S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*) e leveduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) de importância médica; e não foram encontrados isolados com atividade antagonista contra os fungos filamentosos alvos.
- Conclui-se de forma geral que o conhecimento das bactérias associadas aos cocos da palmeira macaúba e de seu potencial enzimático e de produção de substâncias bioativas é importante para subsidiar futuros estudos em outras linhas de pesquisa básica e aplicada envolvendo a palmeira macaúba; incluindo a caracterização e aplicação das substâncias bioativas produzidas. Outro aspecto importante é que este estudo representa o primeiro relato e caracterização da microbiota bacteriana associada aos frutos desta palmeira, uma planta endêmica e de promissor potencial para uso biotecnológico.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, AG; PRIOLLI, RHG; AZEVEDO-FILHO, JA; NUCCI, SM; ZUCCHI, MI; COELHO, RM; COLOMBO, CA (2011). The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*.

ACROTECH: Disponível em: <http://www.acrotech.com.br/>. Acessado em 17 de outubro de 2012.

AGRAWAL, M; PRADEEP, S; CHANDRARAJ, K; GUMMADI, S.N (2005). Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach *Process Biochemistry*: p. 2499-2507.

AHEMAD, M; KHAN, MS (2011). Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100: p. 51–56.

ALKORTA, I; GARBISU, C; LLAMA, MJ; SERRA, JL (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33: p.21-28.

ANDUALEMA, B & GESSESSE, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review (2012). *Biotechnology*: 11; p. 100-118.

ARGANDOÑA, EJS; CHUBA, CAM (2011). Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33: p. 1023-1028.

ASLIM, B; SAGLAM, N; BEYATLI, Y (2002). Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. Turkish Journal of Biology, 26: p. 41-48.

AZEVEDO, JL (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental Microbiology. 6: p. 1244-1251.

BAKRI, Y; JAWHAR, M; ARABI, M; IMAD, E (2008). Improvement of xylanase production by *Cochliobolus sativus* in solid state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 39: p. 602-604.

BANERJEE, UC; SANI, RK., AZMI, W, SONI, R (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Process Biochemistry, 35: p. 213-219.

BANIK, RM; PRAKASH, M (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. Microbiological Research, 159: p. 135-140.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: A Personal View (2005). The journal of antibiotics, 58: p 1-26.

BLANCO, A & PASTOR, FIJ (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. Canadian Journal of Microbiology, 39: p. 1162-1166.

BRAR, SK; VERMA, M; TYAGI, RD; SURAMPALLI, RY; BARNABE, S; VALERO, JR. *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth sporulation and synergism. *Process Biochemistry*, 42: p. 773–790, 2007.

BULUC, M; ATAOGU, H; DOGAN, D; ERGÜN, H; GÜRDAL, H; ERDEMLI, E; DEMIREL-YILMAZ, E (2005). Effect of *Candida albicans* septicemia on the cardiovascular function of rabbits. *International Immunopharmacology*, 5: p. 893-901.

CAO, J; ZHENG, L; CHEN, S (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: p.1013-1016.

Carrim, AJI; Barbosa, EC; Vieira, JDG (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo) Brazilian archives of biology and technology, 49 : p. 353-359.

CASTILHO, LR.; ALVES, LM.; MEDRONHO, RA (1999). Recovery of Pectinolytic enzyme produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*,34: p.181-186.

CHEN, WM; CHANG,JS; CHIU CH; CHANG SC; CHEN,WC; JIANG, CM (2005). *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 415–420.

CHO, KM; HONG, SY; LEE, SM; KIM, YH; KAHNG, GG; LIM, YP; KIM, H; YUN, HD (2007). Endophytic Bacterial Communities in Ginseng and their Antifungal Activity Against Pathogens. *Microbial Ecology*, 54: p. 341-351.

COLEMAN, JJ; GHOSH, S; OKOLI, I; MYLONAKIS, E (2011). Antifungal ctivity of microbial secondary metabolites. *PLoS ONE*, 6: 25321.

CORDERO, P; CAVIGLIASSO, A; PRÍNCIPE, A; GODINO, A; JOFRÉ, E; MORI, G; FISCHER, S (2012). Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grown in a central region of Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, 35: p. 342–351.

CORRÊA, PR; DAVID, PRS; PERES, NP; CUNHA, KC; ALMEIDA, MTG (2009). Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 31: 177-181.

COSTA, R; GOMES, NCM; PEIXOTO, RS; RUMJANEK, N; BERG, G; MENDONÇA-HAGLER, LCS; SMALLA, K (2006). Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: p. 2434-2447.

DAMASIO, ARL; MALLER, A; SILVA, TM; JORGE, JA; TERENCEZI, HF; POLIZELI, MLTM (2011). Biotechnological potential of alternative carbon sources for production of pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Brazilian archives of biology and technology*, 54: p. 141-148.

DANG, H; ZHU, H; WANG, J; LI, T (2009). Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: p. 71-79.

DESWAL, D; SHARMA, A; GUPTA, R; KUHAD, RC (2012). Application of lignocellulolytic enzymes produced under solid state cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 115: p.249–254.

DING, T; JIANG, T; ZHOU, J; XU, L; GAO, ZM (2010). Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genetics and Molecular Research*, 9: 2104-2112.

DONINI, IAN; De Salvi, DTB; Fukumoto, FK; Lustri, WR; Barud, HS.; Marchetto, R; Messaddeq, Y; Ribeiro, SJL (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*, 35: 165-178.

DUTTA, JR; BANERJEE, R (2006). Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: p. 37-47.

ESPARIS, CM; TEIXEIRA, LM; IRINO, K; GIL, PF; ALMEIDA, MMTB; LOPES, GS; BRAVO, VLR; PACHECO, RS; REGUA-MANGIA, AH (2006). Biological and molecular characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in the City of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: p. 573-576.

ETEBARIAN HR; SHOLBERG PL; EASTWELL KC; SAYLER RJ (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: p. 591-598.

FILHO, JAA; COLOMBO, CL, HC, B (2012). Macaúba: palmeira nativa como opção bioenergética. *Pesquisa & Tecnologia*, 9: 4-12.

GALVANI, F; FERNANDES, J (2005). Extração mecânica da polpa da bocaiuva coletada na região de Miranda, MS. Corumbá: Embrapa Pantanal, (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 93). Disponível em <[http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq\\_pdf=CT93](http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT93)>. Acesso em: 31 out. 2012.

GENARI, R (1999). Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Pós-Graduação – UFV, 90 p.

GHASEMI, Y; RASOUL-AMINI, S; KAZEMI, A; ZARRINI, G; MOROWVAT, MH; KARGAR, M (2011). Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. *Microbiology*, 80: p. 483-487.

GOLDMAN, N (2009). Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *Basic Biotechnology*, 5: p. 31-36.

GOMES, DA; SOUZA, AML; LOPES, RV; NUNES, AC; NICOLI, JR (2006). Comparison of Antagonistic Ability against Enteropathogens by G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> Anaerobic Dominant Components of Human Fecal Microbiota. *Folia Microbiologica*, 51: p. 141-145.

GOND, S.K; MISHRA, A; SHARMA, V.K; VERMA, S.K; KUMAR, J; KHARWAR, R.N; KUMAR, A (2012). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience*, 53: p 113-121.

GORLACH-LIRA, K and COUTINHO, HDM (2007). Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 135-141.

GOYAL, M; KALRA, KL; SAREEN, VK and SONI, G (2008). Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:p. 535-541.

GRANÉR, G; PERSSON, P; MEIJER, J; ALSTROM, S (2003). A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *Microbiology Letters*, 224: 269-276.

GUPTA, R; BEG, QK, LORENZ P (2002). Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:15-32.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V, K; CHAUHAN, B (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38 : p 1599- 1616.

HALLMANN, J; QUADT-HALLMANN, A; MAHAFFEE, WF; KLOEPPER, JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: p 895-914.

HANKINL, C & ANAGNOSTAKSIS. ,L (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 47: p.597-607.

HARRISON, L; TELOW, DB; RINALDI, M; TROBEL, G (1991). Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, 137: 2857-2865.

HARTLEY, SE, GANGE, AC (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology*, 54: p.323–342.

HASAN, F; SHAH AA; HAMEED, A (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: p.235–251.

HASSAN, SA; GOWEN, SR (2006). Formulation and Delivery of the Bacterial Antagonist *Bacillus subtilis* for Management of Lentil Vascular Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Phytopathology*, 154: p. 148-155.

HASSANEIN WA; AWNY NM; EI-MOUGITH AA; SALAHEL DSH (2009). The antagonistic activities of some metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* Sh8. *Journal of Applied Sciences Research*, 5: p. 404-414.

HEATON, JC AND JONES, K (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104: p 613-626.

HECK, JX.; HERTZ, PF and AYUB, MAZ (2002). Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: p 213-218.

HÉMATY, K; CHERK, C AND SOMERVILLE, S (2009). Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* , 12: p 406–413.

HENDRICKS, CW; DOYLE, JD; HUGLEY, B (2005). A new solid medium for enumerating cellulose – utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: p 2016-2019.

ISLAM, SMA; MATH , RK; KIM, JM; YUN, MG; CHO, JJ; KIM, EJ; LEE, YH; YUN, HD (2010). Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Current Microbiology*, 61: p 346-356.

JIMÉNEZ, JN; OCAMPO, AM; VANEGAS, JM; RODRÍGUEZ, EA; GARCÉS, CG; PATIÑO, LA; OSPINA, S; CORREA, MM (2011). Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: p. 980-985.

KAI, M; EVMERT, U; BERG, G; PIECHULLA, B (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*. 187: p. 351-360.

KASHYAP DR; VOHRA PK; CHOPRA S AND TEWAR R (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77 : p.215-227.

KHOKHAR I; MUKHTAR, I, MUSHTAQ, S (2011). Isolation and screening of amylolytic filamentous fungi. *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*,\_15: p.203 – 206.

KIM, DY; HAN, M K; LEE, JS; OH, HW; PARK, DS; SHIN, DH ; BAE, KS; SON, KH; PARK, HY (2009). Isolation and characterization of a cellulase-free endo- $\beta$ -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. *Process Biochemistry*. 44:p.1055–1059.

KOUKER, G; JAEGER, K (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: p. 211-213.

KOVTUNOVYCH, G; LAR, O; KAMALOVA, S; KORDYUM, V; KLEINER, D; KOZYROVSKA, N (1999). Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissues. *Plant and Soil*, 215: p. 1-6.

KRISHNA, P; ARORA, A; REDDY, S (2008). An alkaliphilic and xylanolytic strain of actinomycetes *Kocuria* sp. RM1 isolated from extremely alkaline bauxite residue sites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: p. 3079-3085.

KUHAD, RC; GUPTA, S; SINGH A (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* , p: 1-10.

LAMAITA, HC; CERQUEIRA, MMOP; CARMO, LS; SANTOS, DA; PENNA, CFAM; SOUZA, MR (2005). *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57: p. 702-709.

LEE, CW; NG, AYP; NARAYANAN, K; SIM, EUH; NG, CC (2009). Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. *Ciencias Marinas*, 35: p. 153-167.

LEVY, I; SHALIT, I; BIRK, E; SIROTA, L; ASHKENAZI, S; GERMAN, B; LINDER, N (2006). *Candida* endocarditis in neonates: report of five cases and review of the literature. *Mycoses*, 49: p. 43-48.

LI, WJ; ZHANG, YQ; SCHUMANN, P; CHEN, HH; HOZZEIN, WN; TIAN, XP; XU, LH; JIANG, CL (2006). *Kocuria aegyptia* sp. nov., a novel actinobacterium isolated

from a saline, alkaline desert soil in Egypt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: p. 733–737.

LIMA, MM; PEDROZO, EA; JUNQUEIRA, NTV (2008). New paradigm on trade-off biodiesel food: the perennial oleaginous palm tree. IX Simpósio Nacional Cerrado. Brasília, DF.

LIN, L; KAN, X; YAN, H; WANG, D (2012). Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15: p. 2-2.

LISINGEN, LV; CERVI, AC (2009). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., nova ocorrência para a flora do Estado do Paraná. *Acta Biológica Paranaense*, 38: p.187-192.

LOBO, IP; FERREIRA, SLC; CRUZ, RS (2009). Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, 32: 1596-1608.

LODEWYCKX, C; VANGRONVELD, J; PORTEOUS, F; MOORE, ERB; TAGHAVI, S; MEZGEAY, M; LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: p 583-606.

LORENZI, GMAC (2006). *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Dissertação (Doutorado em Agronomia e Produção Vegetal) – Pós Graduação – Universidade Federal do Paraná.

MAAREL, MJEC; VEEN, BVD; UITDEHAAG, JCM; LEEMHUIS, H; DIJKHUIZEN, L (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase Family. *Journal of Biotechnology*, 94: p. 137–155.

MANFIO, CE; MOTOYKE, SY; RESENDE, MDV; SANTOS, CEM; SATO, AY; LIMA, MM; PEDROZO, EA; JUNQUEIRA, NTV (2012). Avaliação de progênies de macaúba na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 32: 63-68.

MARGALL, M; DOMÍNGUEZ, A; PRATS, G; SALLERAS, L (1997). *Escherichia coli* Henterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71: p. 437-443.

MCCULLOUGH, MJ; ROSS, BC; READE, PC (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25: o. 136-144.

MENDES, RA; COELHO, AIM; AZEREDO, RMC (2011). Contamination by *Bacillus cereus* on equipment and utensil surfaces in a food and nutrition service unit. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16: p. 3933-3938.

MOURA, EF; VENTRELLA, MC; MOTOIKE, SY (2010). Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola*, 67: p.375–495.

MUZZAMAL, H; SARWAR, R; SAJID, I; HASNAIN, S (2012). Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan Journal of Zoology*, 44: 12-17.

NETO, AR; SILVA, F.G; SALES, J.F; REIS, E.F; SILVA, M.V.V; SOUZA, A.L (2012). Effect of drying and soaking fruits and seeds on germination of macaw palm (*Acrocomia aculeata* [Jacq.] Loddiges ex MART.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34: 179-185.

NUCCI, SM (2007). Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC, 87 p.

OLIVEIRA, AN; OLIVEIRA, LA; ANDRADE, JS; JÚNIOR, AFC (2006). Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 26 (4): p.853-860.

OLIVEIRA, DA; MELO, JAF; BRANDÃO, MM; RODRIGUES, L.A; MENEZES, EV; FERREIRA, PRB (2012). Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11: p.531-538.

OVIEDO, AM; SÁNCHEZ, PG; PUEO, E; CHOPO, JM (2006). Artritis séptica como manifestación inicial de endocarditis bacteriana por *Staphylococcus aureus*. *Anales de Medicina Interna*, 23: p. 184-186.

PHUTELA, U; DHUNA, V; SANDHU, S; CHADHA, BS (2005). Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal Microbiology*. 36: 63-69.

PINTO, UM; COSTA, ED; MANTOVANI, HC; VANETTI, MCD (2010). THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Pseudomonas Fluorescens* 07A ISOLATED FROM MILK IS NOT REGULATED BY QUORUM SENSING SIGNALS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: p. 91-96.

PITCHER, DG; SAUNDERS, NA; OWEN, RJ (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8: p. 151–156.

PRAKASH, O; JAISWAL, N (2010). alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: p. 2401-2414.

QUIROZ-CASTANEDA, RE; FOLCH-MALLOL, JL (2011). Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Biotechnology Applied*. 28: 205-215.

RAAIJMAKERS, J.M; VLAMI, M; SOUZA, JT (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: p 537-547.

RAI, SK, MUKHERJEE, AK (2009). Ecological significance and some biotechnological application of an organic stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. *Bioresource Technology*, 100: p.2642-2645.

RAMOS, LP; KUCEK, KT; DOMINGOS, A.K; WILHELM, H.M (2003) Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil (Disponível em:[http://www.faculdadesantamaria.com.br/web/sustentabilidade/templates/rt\\_catalyst\\_j15/download/biodiesel.pdf](http://www.faculdadesantamaria.com.br/web/sustentabilidade/templates/rt_catalyst_j15/download/biodiesel.pdf), acessado em 09 de outubro de 2012

RODARTE, MP; DIAS, DR; VILELA, DM; SCHWAN, RF (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33: p. 457-464.

RÖRIG, KCO; COLACITE, J; ABEGG, MA (2009). Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42: p. 225-227.

ROSENBLUETH, M; MARTÍNEZ-ROMERO, E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: p 827-837.

SAGAHÓN, IP; REYES, MAA; ROJAS, HVS; CUENCA, AA; JURADO, AT; ÁLVAREZ, IOC; FLORES, YM (2011). Isolation of Bacteria with Antifungal Activity

against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. International Journal of Molecular Sciences, 12: p. 5522-5537.

SAIKKONEN, K; WÄLI, P; HELANDER, M; FAETH, SH (2004). Evolution of endophyte plant symbioses. Trends Plant Science, 9 : p. 275–280.

SAITO, A; IKEDA, S; EZURA, H; MINAMISAWA, K (2007). Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. Microbes environmental, 22: 93-105.

SARKAR, P; YAMASAKI, S; BASAK, S; BERA, A; BAG, PK (2012). Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. Process Biochemistry, 47: P. 858-866.

SALUSTIANO, VC; ANDRADE, NJ; RIBEIRO JÚNIOR, JI; FERNANDES, PE; LOPES, JP; BERNARDES, PC; PORTUGAL, JG (2010). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 62: p. 1478-1483.

SERRACARBASSA, PD; DOTTO, P (2003). *Candida albicans* endophthalmitis. Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, 66: p. 701-707.

SEVINC, N; DEMIRKAN, E (2011). Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. Journal of Biological & Environmental Sciences, 5: p. 95-103.

SHARMA, PK; CHAND, D (2012). Production of cellulase free thermostable xylanase from *Pseudomonas* sp. XPB-6. International Research Journal of Biological Sciences, 1: p. 31-41.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, UC (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, 19: p. 627–662.

SINGH, J; BATRA, N; SOBTI, RC (2004). Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 31: 51-56.

SINGH, J; KAUR, P (2012). Optimization of Process Parameters for Cellulase Production from *Bacillus* sp. JS14 in Solid Substrate Fermentation Using Response Surface Methodology. Brazilian Archives of Biology and Technology, 55: p. 505-512.

SOBRAL, K.J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; KLEINER, P.A.A (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6: p. 1244-1251.

STROBEL, G; DAISY, B (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67: p 491-502.

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

SOUZA, PM; MAGALHAES, PO (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal Microbiology*, 41: 850-861.

UENOJO M & PASTORE, GM (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *quimica nova*, 30: 388-394.

UFFEN, R.L (1997). Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity (1997). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: p.1–6.

WATANABE, T; KANNO, M; TAGAWA, M; TAMAKI, H; KAMAGATA, Y (2012). Primary simple assays of cellulose-degrading fungi. *Mycoscience*, 53: p.45-48.

WILLERDING, AL; DE OLIVEIRA, LA; MOREIRA, FW; GERMANO, MG; CHAGAS, AF (2011). Lipase activity among bacteria isolated from amazonian soils. *Enzyme Research*, 5: 1-5.

JAYSANKAR SING YADAV, SANHITA CHOWDHURY AND SHAON RAY CHAUDHURI, 2010. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from East Calcutta Wetland. *Journal of Biological Sciences*, 10: 424-431.

YADAV, JS; CHOWDHURY, S; CHAUDHURI, SR (2010). Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from East Calcutta Wetland. *Journal of Biological Sciences*, 10: p. 424-431.

YILMAZ, M; SORAN, H; BEYATLI, Y (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161: p. 127-131.

YRJÄLÄ, K; MANCANO, G; FORTELIUS, C; AKERMAN, ML; SIPILÄ, T (2010).  
The *incidence of Burkholderia in epiphytic and endophytic bacterial cenoses in hybrid aspen grown on sandy peat. Boreal Environment Research, 15: p 81-96.*

ZHOU, G; LUO, X; TANG, Y; ZHANG, L; YANG, Q; QIU, Y; FANG, C (2008).  
*Kocuria flava* sp. nov. and *Kocuria turfanensis* sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: p. 1304–1307.*