

**PERFIL DA MASSA MOLAR DA LEVANA PRODUZIDA POR *Bacillus subtilis*  
(*natto*) EM MEIO CONTENDO SACAROSE**

**Leandro Freire dos Santos, Siliane Denise Berté, Nelson Janeiro Rodriguez,  
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi\***

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Rodovia Celso Garcia Cid |PR 445 Km 380|, Londrina (PR), CEP 86051-990. \* e-mail: macelligoi@uel.br

A levana é um polissacarídeo extracelular constituída predominantemente por resíduos de D-frutose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6); podendo ainda apresentar pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) e um resíduo de glucose terminal. A levana apresenta ampla aplicabilidade em diferentes setores da economia e, para sua efetiva aplicação, deve-se caracterizá-la quanto à sua massa molar. Determinadas funções ou atividades biológicas, inerentes a alguns exopolissacarídeos, como a levana, são estritas a certas faixas de massa molar. Levana de massa molar intermediária é aplicada na produção de extensores plasmáticos; enquanto àquelas de alta massa molar são preteridas na indústria alimentícia como viscosificantes. O *Bacillus subtilis* (*natto*) apresenta-se como potencial produtor da levana, e estudos abordando sua massa molar devem ser conduzidos procurando eficiente e correta aplicação de tal produto. Levana produzida pelo *Bacillus subtilis* isolado do *natto*, em meio contendo sacarose, foi caracterizada quanto a sua massa molar nas seguintes condições de fermentação: temperatura de 37°C, 16h e 150 rpm em mesa agitadora, em meio de cultura com 400g de sacarose. O processo fermentativo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 2L com volume de trabalho de 500mL. A levana produzida foi precipitada do sobrenadante com etanol absoluto (1:3 v/v) e então submetida à coluna de Sepharose 6B, tendo como eluente o tampão fosfato 50mM (em pH 7,0), com vazão de 14mL/h. Os volumes coletados foram de 3,5mL a cada 15 minutos. A seguir, amostras de 0,5mL foram aplicadas a 4mg/mL em relação aos açúcares totais, apresentando, conforme quantidade total de açúcares eluídos, levana de duas massas moleculares: aproximadamente de 568.000 Da e < 50.000 Da; nas quantidades 13,39 e 86,61% respectivamente. Tais resultados sugerem que a natureza polimérica de grande parte do material formado, em meio contendo sacarose, estava composta principalmente de levana de baixa massa molar.

Apoio: Capes, CNPQ, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

## **AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE EXOPOLISSACARÍDEO DE FRUTOSE**

**Leandro Freire dos Santos, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi\***

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Rodovia Celso Garcia Cid |PR 445 Km 380|, Londrina (PR), CEP 86051-990. \* e-mail: macelligoi@uel.br

Os exopolissacarídeos (EPS) são carboidratos que podem ser amplamente produzidos por diferentes microrganismos. Os EPS apresentam ampla aplicabilidade em diferentes setores da economia, com destaque na indústria alimentícia, contribuindo para o aumento da textura, viscosidade e elasticidade dos alimentos. Diversos estudos objetivam otimizar a produção destes EPS, procurando as melhores condições de produção, planejamento fatorial e metodologias de superfície de resposta tem sido grandemente utilizados. A hidrólise destes EPS, quando utilizada a metodologia de dosagem de açúcar redutor, finda-se como etapa crítica na quantificação e avaliação destas metodologias de otimização. Entretanto, são vastas as variações nos parâmetros utilizados na hidrólise, principalmente quanto à variável ‘tempo’. Considerando os fatores acima, objetivou-se avaliar os parâmetros ‘temperatura’ e ‘tempo’ de hidrólise do exopolissacarídeo frutósido levana. Esta, produzida por *Bacillus subtilis* (*natto*), em meio definido contendo 40% de sacarose (p/V), foi hidrolisada com 1mL ácido clorídrico 0,1N a 60°C, 1h e a 100°C com 1; 1,5 e 2h. Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de troca iônica de alta pressão, e separados isocriticamente (NaOH 14mM) usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250mm) equipada com uma pré-coluna PA1 com velocidade de fluxo de 1,0mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando H<sub>2</sub>O deionizada (eluente 1) e NaOH 200mM (eluente 2). Em todas as condições de hidrólise testadas, foram observadas apenas picos de glucose e frutose; sem diferenças significativas entre as condições hidrolíticas, DP 0,205 e 0,175 respectivamente. Não foram detectados picos que pudessem arremeter a presença de fruto-oligossacarídeos decorrentes da hidrólise parcial da levana. Todas as condições de hidrólise estudadas foram similares no fornecimento de açúcares redutores. Metodologias apropriadas de hidrólise contribuem para otimização das técnicas, nas quais são utilizadas dosagem de açúcar redutor; contribuindo para a sua aplicabilidade.

Apoio: Capes, CNPQ, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

**PERFIL DO DESENVOLVIMENTO DE *Ganoderma lucidum* EM COROA DE  
ABACAXI MOÍDA**

**Caroline Aparecida Vaz de Araujo, Cristina Giatti Marques de Souza,  
Rosane Marina Peralta**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica. Av. Colombo, n. 5790,  
Maringá (PR), Cep: 87020-900. e-mail: carolly\_miga@hotmail.com

O cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* possui excelente qualidade nutricional e várias propriedades funcionais comprovadas. É um basidiomiceto, conhecido popularmente no Japão como Reishi, e no Brasil como “Cogumelo Rei”. É um fungo causador da podridão branca, devido à capacidade de sintetizar enzimas responsáveis pela degradação de polímeros da madeira, sendo também utilizado em processos de biorremediação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e a produção de enzimas oxidativas, pelo fungo, utilizando resíduo agroindustrial (coroa de abacaxi moída), o qual constitui um meio de baixo custo e contribui para resolver problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. Utilizou-se como substrato 4g de coroa de abacaxi moída. O material foi colocado em erlenmeyer de 250mL, umedecido com 50mL de solução de sais de Vogel, esterilizado a 120°C (1 atm) e inoculado com o fungo. Os cultivos permaneceram na estufa por tempo determinado: 10, 15, 20 e 25 dias. Estes foram interrompidos pelo acréscimo de 20mL de água destilada e filtrados. O fungo se desenvolveu bem neste substrato, atingindo seu crescimento máximo entre 15 e 20 dias de cultivo. Entre as oxidases pesquisadas a lacase teve sua atividade máxima no 10º dia (449,55 U/g de biomassa seca) e a Mn peroxidase não foi encontrada nestas condições. É amplamente relatado que lacases são induzidas por compostos fenólicos sintéticos ou de fontes naturais, e a determinação destes compostos nos filtrados de cultivo de *G. lucidum* mostra que a secreção desta enzima está relacionada com a presença de fenólicos solúveis no meio. Considerando o desenvolvimento do fungo, a coroa de abacaxi torna-se um substrato promissor em novos estudos para a obtenção de enzimas e outros produtos bioativos.

Apoio: CNPq/UEM.

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolius* COM ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* CONTRA O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata***

**Elisiani Alvares Angelim, Glaucia Januário, Rosiane Marcia Xaveir,  
Ravelly Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep: 87020-900. e-mail: elisianiangelim@bol.com.br

Endófitos são fungos que habitam o interior de plantas saudáveis protegendo-as contra patógenos. A aroeira, *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) possui uma grande aplicabilidade medicinal e propriedades antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. *Alternaria alternata* é um fitopatógeno causador da podridão em várias culturas como manga, tomate e leguminosas. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos endofíticos de folhas de aroeira e verificar seu potencial no controle, *in vitro*, de *A. alternata*. Folhas desta planta foram coletadas no Campus sede da Universidade Estadual de Maringá (PR) e desinfetadas superficialmente com: água corrente, solução de Tween 80, álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 5% (3 minutos), álcool 70% (30 segundos) e enxágue em água destilada autoclavada. Fragmentos de folha de 1cm<sup>2</sup> foram colocados em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina e incubados por 7 dias em BOD a 28°C. Um controle foi realizado com a água do último enxágue. A atividade antagonística do isolado foi testada. Foram inoculados o isolado endofítico e o fitopatógeno, em pólos opostos da placa de Petri, equidistantes, em triplicata, bem como os controles: apenas o fitopatógeno em um pólo da placa e, o outro com o fitopatógeno nos dois pólos. Após 7 dias de incubação em BOD a 28°C o índice de antagonismo foi calculado. A interação endófito-patógeno foi analisada segundo a escala de Badalyan. A frequência de isolamento obtida foi de 50% e a ausência de microrganismos no controle indica eficiência no processo de desinfecção. O isolado testado apresentou interação do tipo CA1 (crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois de *deadlock* inicial com contato micelial), com índice de antagonismo de 43,80%. Estes resultados indicam a presença de fungos endofíticos em folhas de *S. terebinthifolius* com potencial para o controle biológico do fitopatógeno *A. alternata*.

**ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE FOLHAS DE *Balfourodendron riedelianum* CONTRA  
O FITOPATÓGENO *Moniliophthora perniciosa***

**Andréia Bortolotti Frueh, Leonardo Augusto de Oliveira, Ravelly Casarotti Orlandelli,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: deiafrueh@hotmail.com

Microrganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas saudáveis, sem causar aparentemente dano a tais hospedeiros. A madeira do *Balfourodendron riedelianum*, planta conhecida popularmente como pau-marfim é indicada para a fabricação de móveis de luxo, molduras, para a construção civil e marcenaria em geral. Pode também ser empregada na arborização de parques, jardins, em plantios visando a recomposição da vegetação e recuperação de áreas degradadas. O fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa* causa uma importante enfermidade, conhecida como vassoura-de-bruxa, no cacaueteiro (*Theobroma cacao*). O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos isolados de folhas de *B. riedelianum* no controle *in vitro* do fungo fitopatogênico *M. perniciosa*. A atividade antagonística de dois endófitos foi testada em experimentos com cultura dupla em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Foram inoculados, em cada placa, o fungo endofítico isolado e o fitopatogênico a ser testado, em pólos opostos, equidistantes. Cada combinação de endófito/patógeno foi repetida 3 vezes, bem como os controles negativos: o primeiro apenas com o fitopatogênico em um pólo da placa e o segundo, com o fitopatogênico nos dois pólos. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A caracterização do efeito do endófito sobre o crescimento da colônia do fitopatogênico foi realizada observando-se o antagonismo, de acordo com a escala de Badalyan. Os isolados testados apresentaram interação do tipo A = “deadlock” com contato micelial. O isolado 1 apresentou índice de antagonismo de 21,71% e o isolado 2 apresentou índice de 7,72%. Estes resultados indicam que fungos endofíticos isolados de folhas de *B. riedelianum* apresentam potencial biotecnológico no controle do fitopatogênico *M. perniciosa*.

**ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE FOLHAS DE *Murraya paniculata* CONTRA  
O FITOPATÓGENO *Moniliophthora perniciosa***

**Cleber Ricardo da Cruz de Oliveira, Fabio Quirino da Silva, José Soares de Andrade,  
Ravely Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: cleberoliveira.biologo@gmail.com

Fungos endofíticos são considerados eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. A Biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social, sendo os fungos de grande interesse biotecnológico, por serem os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população. A vassoura-de-bruxa, doença causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, consiste numa importante enfermidade do cacaueteiro, ocorrendo em todas as regiões do Brasil e trazendo grandes prejuízos para os produtores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados de folhas de *Murraya paniculata* no biocontrole do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. Foi realizado o teste de antagonismo *in vitro*: os fungos (endofíticos e fitopatógeno) foram repicados em placas com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), para obtenção de colônias jovens. Em seguida, em placas com meio BDA, foram inoculados o endófito e o fitopatógeno, equidistantes, em triplicata. Dois controles foram realizados: um com o fitopatógeno inoculado em 2 pontos equidistantes da placa e o outro, apenas com o fitopatógeno inoculado de um lado da placa. As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 7 dias e o resultado avaliado segundo a escala de Badalyan. Verificou-se que os dois endófitos testados (A e B), apresentaram antagonismo, com índices de inibição de 19,71% e 22,67%, respectivamente. Os dois endófitos selecionados para o teste de antagonismo apresentaram interação do tipo A = “deadlock” com contato micelial. No presente estudo, verificou-se que fungos endofíticos isolados de *Murraya paniculata* possuem potencial para o controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE  
*Balfourodendron riedelianum* (RUTACEAE)**

**Simone Satie Fernandes Ito, Cláudia Batista Favreto, Ravelly Casarotti Orlandelli,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: Simone Satie\_ito@yahoo.com.br

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam o interior dos tecidos vegetais, desenvolvendo-se junto com a planta hospedeira sem causar-lhe sintomas de doenças aparentes. Produzem, em interação com ela, seus metabólitos e são uma fonte promissora de novas substâncias bioativas. A madeira do *Balfourodendron riedelianum*, conhecida popularmente como pau-marfim, é indicada para a fabricação de móveis de luxo, molduras, para a construção civil e marcenaria em geral. Pode também ser empregada na arborização de parques, jardins, em plantios visando à recomposição de vegetação e recuperação de áreas degradadas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de fungos endofíticos em folhas de *Balfourodendron riedelianum*. Foram coletadas folhas desta espécie vegetal, cultivada na Universidade Estadual de Maringá, as quais foram submetidas a um processo de desinfecção superficial: foram lavadas com água corrente, solução de Tween 80, água corrente novamente, e a seguir, incubadas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 5% (3 minutos), posteriormente incubadas em álcool 70% (30 segundos) e enxaguadas em água destilada autoclavada. Em seguida, as folhas foram cortadas em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e colocadas em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina, e incubadas em BOD a 28°C por 7 dias. Um controle negativo foi realizado com a água do último enxágue. A frequência de colonização foi de 100%. Nas placas de controle não houve crescimento de fungos, indicando que o processo de desinfecção foi eficiente. Estes resultados iniciais indicam a presença de uma comunidade endofítica em folhas de *Balfourodendron riedelianum*, mas estudos complementares poderão ser realizados para verificar as possíveis propriedades destes fungos e a identificação das espécies obtidas neste isolamento.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE  
*Murraya paniculata* (RUTACEAE)**

**José Soares Andrade, Rodrigo Renolfi Erler, Ravelly Casarotti Orlandelli,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: rodrigo\_erler@hotmail.com

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de plantas sadias sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro, podendo protegê-lo contra doenças e organismos patogênicos. Talvez sejam os fungos, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população. A planta *Murraya paniculata*, pertence à família Rutaceae e é conhecida como Murta-de-cheiro. Esta pequena árvore ou arbusto, nativa da Ásia, possui propriedades medicinais, sendo suas folhas e cascas dos troncos utilizados na medicina popular como analgésico, para o tratamento de eczemas e reumatismo, além de combater diarreia e disenteria. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de fungos endofíticos em folhas de *M. paniculata*. As folhas desta espécie vegetal, coletadas na Universidade Estadual de Maringá (PR), passaram por um processo de desinfecção superficial, que consistiu em lavagem com água corrente, Tween 80, álcool 70% (1 minuto), hipoclorito 5% durante 3 minutos, álcool 70% durante 30 segundos e enxágue em água destilada autoclavada. Em seguida, as folhas foram cortadas em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e colocadas em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina. As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 7 dias. Um controle foi feito com a água do último enxágue. Após 7 dias de incubação em BOD, foi verificada uma frequência de isolamento de 20%. A ausência de microrganismos na placa controle indica que o processo de desinfecção superficial foi eficiente. Estes resultados preliminares indicam a presença de fungos endofíticos em folhas de *M. paniculata*. Estudos posteriores poderão ser realizados para verificar as propriedades biotecnológicas destes fungos e análises moleculares poderão ser realizadas para identificar as espécies isoladas.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SEGMENTOS CAULINARES DE  
*Murraya paniculata* (RUTACEAE)**

**Vera Lúcia Delmônico Vilela, Camila Mello Pereira, Francielli Andreassi,  
Ravely Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: veradelmonico@yahoo.com.br

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam o interior de tecidos vegetais sadios sem que causem sintomas de doenças nesses hospedeiros. Possuem aplicação biotecnológica em diversas áreas, como indústria alimentícia e farmacêutica, como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas e ainda como agentes inibidores de pragas e patógenos. Conhecida como murta-de-cheiro, *Murraya paniculata* (Rutaceae) é popularmente utilizada como analgésico e para o tratamento de problemas intestinais, eczemas e reumatismo. O objetivo principal deste trabalho foi verificar a presença de fungos endofíticos em segmentos caulinares de *M. paniculata*. Foram coletados segmentos caulinares desta espécie vegetal, cultivada na Universidade Estadual de Maringá, os quais foram submetidos a um processo de desinfecção superficial: foram lavados com água corrente, solução de Tween 80, novamente água corrente e, a seguir incubados em álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio 5% (3 minutos), álcool 70% (30 segundos) e enxaguados em água destilada autoclavada. Os segmentos caulinares foram cortados em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e colocados em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina e incubadas em BOD a 28°C durante 7 dias. Um controle negativo foi realizado com a água utilizada no último enxágue. Após 7 dias, a frequência de colonização dos endófitos obtida foi de 100%. Nas placas controle não houve crescimento de microrganismos, o que indica que o processo de desinfecção superficial foi eficiente. Estes resultados indicam a existência de fungos endofíticos em segmentos caulinares de *M. paniculata*. Posteriormente, as espécies isoladas poderão ser identificadas com estudos moleculares e estudos complementares podem ser realizados para verificar as possíveis propriedades destes fungos.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM CAULES DE  
*Balfourodendron riedelianum* (RUTACEAE)**

**Kaline Chiozzini Porto, Aline Gomes Antonietto, Nathalie Dantas,  
Ravely Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: kalinechiozzini@yahoo.com.br

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de tecidos ou órgãos dos vegetais. A produção de substâncias pelos fungos endofíticos apresenta aplicações na agroindústria, como por exemplo, no controle biológico de pragas e doenças. Endófitos podem também ser utilizados como vetores – hospedeiros para transformação genética em plantas. O pau-marfim, *Balfourodendron riedelianum* (Rutaceae) é uma árvore de grande porte, muito apreciada e valorizada no mercado, fornecedora de madeira clara e de boa qualidade. Suas folhas possuem 22% de proteína bruta e 1,6% de tanino, podendo ser utilizadas na alimentação animal, sendo comumente utilizadas na medicina popular para combater reumatismo. Da casca do caule extrai-se um óleo indicado para combater bronquite, diabete e febre. Com o objetivo de verificar a presença de fungos endofíticos em porções jovens do caule de *B. riedelianum*, foram coletadas amostras desta espécie vegetal, cultivada na Universidade Estadual de Maringá (PR), as quais foram submetidas a um processo de desinfecção superficial: foram lavadas com água corrente, solução de Tween 80, água corrente novamente e, a seguir, incubadas em álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio 5% (3 minutos), posteriormente incubadas em álcool 70% (30 segundos) e enxaguadas em água destilada autoclavada. Em seguida, os seguimentos de caules foram cortados em fragmentos de 1cm<sup>2</sup> e colocadas em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina e incubadas em BOD a 28°C por 7 dias. Um controle negativo foi realizado com a água do último enxágue. Verificou-se a taxa de isolamento dos fungos, obtendo o valor de 100%. Nas placas de controle não houve crescimento de microrganismos, indicando que o processo de desinfecção foi eficiente. Estes resultados iniciais indicam a presença de uma comunidade endofítica em caules jovens de *B. riedelianum*, mas estudos complementares podem ser realizados para verificar as possíveis propriedades destes fungos e a identificação das espécies isoladas.

Apoio: Laboratório de Biotecnologia Microbiana.

**ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE CAULES DE *Balfourodendron riedelianum* CONTRA O  
FITOPATÓGENO *Guignardia citricarpa***

**Verônica Aureliana Fassina, Thaismara Martins, Silvana Onofre,  
Ravelly Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: verônica\_fassina@hotmail.com

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior da planta hospedeira sem causar-lhe danos, podendo ser isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente. São utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e fontes de metabólitos de interesse. O pau-marfim, *Balfourodendron riedelianum*, é uma árvore de grande porte, muito apreciada e valorizada no mercado, fornecedora de madeira clara e de boa qualidade; as suas folhas são utilizadas na medicina popular para combater reumatismo e de sua casca extrai-se um óleo indicado para combater bronquite, diabete e febre. O fungo *Guignardia citricarpa*, agente causador da mancha preta dos *Citrus* spp., causa a queda prematura dos frutos e leva a reduções na produção. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de endófitos de segmentos de caules de *B. riedelianum* no controle do fitopatógeno *G. citricarpa*. A atividade antagonística de dois endófitos foi testada em experimentos com cultura dupla em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Foram inoculados, em cada placa, o endófito isolado e o fitopatógeno a ser testado, em pólos opostos, equidistantes. Cada combinação de endófito/patógeno foi repetida 3 vezes, bem como os controles negativos: o primeiro apenas com o fitopatógeno em um pólo da placa, e o segundo, com o fitopatógeno nos dois pólos. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A caracterização do efeito endofítico sobre o crescimento da colônia do fitopatógeno foi realizada observando-se o antagonismo, de acordo com a escala de Badalyan. Os isolados testados apresentaram interação do tipo A “deadlock” com contato micelial. O isolado 1 apresentou índice de antagonismo de 27,03% e o isolado 2, de 25,36%. Estes resultados indicam que fungos endofíticos isolados dos segmentos caulinares de *B. riedelianum* apresentam potencial biotecnológico no controle *in vitro* do fitopatógeno *G. citricarpa*.

**ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DOS SEGMENTOS CAULINARES DE *Schinus terebinthifolius*  
CONTRA O FITOPATÓGENO *Colletotrichum* sp.**

**Ariane da Silva Paes, Leonardo José da Silva, Ravelly Casarotti Orlandelli,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: arianepaes@hotmail.com, pageleo@hotmail.com

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que vivem sistematicamente no interior das plantas sem causar aparentemente dano ao hospedeiro. Vários endofíticos são capazes de produzir antibióticos, podem ser utilizados como biorremediadores de solo contaminado, atuando também como bioindicadores de vitalidade vegetal, além de produzirem metabólitos secundários de interesse farmacológico. A aroeira, nome popular da planta *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) tem propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes. Algumas espécies de *Colletotrichum* são fitopatogênicas e atacam principalmente árvores frutíferas com grande valor comercial, como mangueiras, bananeiras e guaranazeiros. As doenças mais comuns causadas por fitopatógenos deste gênero são as antracnoses e a ramulose. No Brasil, as culturas de guaranazeiro e algodoeiro são as mais atacadas por estas doenças, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos isolados dos segmentos caulinares de *S. terebinthifolius* no controle do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. A atividade antagonística de dois endófitos foi testada em experimentos com cultura dupla em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Foram inoculados, em cada placa, o fungo endofítico isolado e o fitopatógeno a ser testado, em pólos opostos, equidistantes. Cada combinação de endófito/patógeno foi repetida 3 vezes, bem como os controles negativos: o primeiro apenas com o fitopatógeno em um pólo da placa e o segundo, com o fitopatógeno nos dois pólos. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A caracterização do efeito do endofítico sobre o crescimento da colônia do fitopatógeno foi realizada observando-se o antagonismo, de acordo com a escala de Badalyan. Os isolados testados apresentaram interação do tipo A, deadlock com contato micelial, com índice de antagonismo igual a 32,77% para o isolado 1 e índice igual a 27,01% para o isolado 2. Estes resultados indicam que fungos endofíticos isolados dos segmentos caulinares de *S. terebinthifolius* apresentam potencial biotecnológico no controle do fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE  
*Piper hispidum* EM MEIO CONTENDO CORANTE VERMELHO  
PARA TINGIMENTO DE VESTUÁRIO**

**Raiani Nascimento Alberto, Ravelly Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: raiani\_mica@hotmail.com

Microorganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, às quais associam-se de forma mutualística, competindo com patógenos, diminuindo a herbivoria e o ataque de insetos, aumentando a tolerância a estresses abióticos e bióticos, protegendo a planta e favorecendo seu crescimento, recebendo em contra-partida, proteção e nutrientes do seu hospedeiro. Os fungos endofíticos não causam aparente dano às suas plantas hospedeiras, distinguindo-se dos fungos patogênicos (que causam doenças em plantas) e dos fungos epifíticos (que vivem na superfície dos vegetais). Alguns endófitos podem ser empregados como biorremediadores na retirada de contaminantes industriais do ambiente. Estudos sobre a biorremediação têm sido realizados com o objetivo de utilizar os fungos e bactérias para complementar e otimizar os atuais sistemas de tratamento de efluentes das empresas têxtil na degradação dos corantes e poluentes, diminuindo assim a agressão ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi verificar o crescimento de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* (Piperaceae) na presença do corante vermelho para tingimento de vestuário. Os isolados 23, 46, 127, 135 foram repicados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e em meio BDA suplementado com corante vermelho para tingimento de vestuário e incubados a 28°C em BOD por 7 dias. Após esse período, foi comparado o crescimento dos fungos na ausência e na presença de corante. O crescimento dos isolados em ambos os meios foi equivalente, mostrando a tolerância desses endófitos à presença do corante vermelho. Estes resultados indicam que os isolados testados são tolerantes ao corante, indicando seu potencial biotecnológico nos processos de biorremediação.

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE  
*Piper hispidum* EM MEIO CONTENDO CORANTE AZUL PARA  
TINGIMENTO DE JEANS**

**Raiani Nascimento Alberto, Ravelly Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: raiani\_mica@hotmail.com

Endófitos são geralmente fungos e bactérias que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais, interagindo sistematicamente com seus hospedeiros sem causar-lhes aparente dano. Esses microrganismos podem ser isolados do interior de tecidos vegetais previamente desinfetados, para que não sejam isolados juntamente os microrganismos epifíticos. A variedade de endófitos que pode ser encontrada depende da planta hospedeira e a sua idade, distribuição geográfica, clima, altitude, precipitação, entre outros fatores. Alguns endófitos podem ser empregados como biorremediadores na retirada de contaminantes industriais do ambiente. Estudos sobre a biorremediação têm sido realizados com o objetivo de utilizar os fungos e bactérias para complementar e otimizar os atuais sistemas de tratamento de efluentes das empresas têxtil, na degradação dos corantes e poluentes, diminuindo assim a agressão ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi verificar o crescimento de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* (Piperaceae) na presença do corante azul para tingimento de jeans. Os isolados 23, 46, 127, 135 foram repicados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e em meio BDA suplementado com corante azul para tingimento de jeans e incubados a 28°C em BOD por 7 dias. Após esse período, foi comparado o crescimento dos fungos na ausência e na presença de corante. O crescimento dos isolados, em ambos os meios, foi equivalente, mostrando a tolerância desses endófitos à presença do corante azul para tingimento de jeans. Estes resultados indicam que os isolados testados são tolerantes ao corante, indicando seu potencial biotecnológico nos processos de biorremediação.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE  
*Piper hispidum* Sw. (PIPERACEAE)**

**Ravelly Casarotti Orlandelli, Vânia Specian, Raiani Nascimento Alberto,  
Celso João Rubin Filho, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº. 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: ravelycasarotti@gmail.com

Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sadios sem causar-lhes aparente dano. A composição das espécies de endófitos pode variar de acordo com a planta hospedeira, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais. A interação planta-endófito é mutualística, tendo a planta a função de fornece nutrientes e proteção ao fungo, recebendo maior resistência a ambientes com intenso estresse. O estudo destes microrganismos é de grande importância, devido à falta de informações para elucidar a base biológica de suas interações com as plantas hospedeiras. *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae) é conhecida como jaborandi ou falso-jaborandi, e no Brasil encontra-se no Amazonas, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Essa planta possui amidas de ação antifúngica e, entre seus usos medicinais, estão o combate a: dores estomacais, hemorróidas, reumatismos, disenterias, hérnia de umbigo de crianças e desobstrução do fígado, tendo este trabalho o objetivo de verificar a presença de fungos endofíticos nas folhas de *P. hispidum*. Foram coletadas folhas saudáveis desta espécie vegetal, localizada no Horto Florestal "Dr. Luiz Teixeira Mendes" em Maringá, as quais foram submetidas a um processo de desinfecção superficial que incluiu lavagem em água corrente, solução de Tween 80, água destilada autoclavada, álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 3% (3 minutos), álcool 70% (30 segundos) e, por fim, enxágue em água destilada autoclavada. As folhas foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup>, colocadas em placas de Petri com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina e incubadas a 28°C em BOD por 7 dias. A frequência de isolamento obtida foi de 96,59%. Este resultado comprova a existência de fungos endofíticos em *P. hispidum*. Será realizado o estudo da interação desses fungos com a planta hospedeira e as espécies isoladas serão identificadas por análises moleculares.

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM TECIDOS CAULINARES DE  
*Schinus terebinthifolius* (ANACARDIACEAE)**

**Ana Paula T. K. de Araújo, Pedro Paulo Lachner Violato, Ravelly Casarotti Orlandelli,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: ap8281@hotmail.com, Pedrinho\_lachner@yahoo.com.br

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem sistematicamente no interior das plantas saudáveis, sem causar aparentemente dano ao hospedeiro. Endófitos são capazes de produzir antibióticos, mas também podem ser utilizados como bioindicadores de vitalidade ou como biorremediadores de solo contaminado, além de produzirem metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica. O uso medicinal da aroeira (*Schinus terebinthifolius*), família Anacardiaceae, é descrito há muitos anos. Diversas pesquisas têm evidenciado as propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes desta planta. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de fungos endofíticos nos tecidos caulinares de *S. terebinthifolius*. Foram coletadas amostras de caule jovens desta espécie vegetal, cultivada na Universidade Estadual de Maringá, as quais foram submetidas a um processo de desinfecção superficial: foram lavadas com água corrente, solução de Tween 80, água corrente novamente e a seguir incubadas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 5% (3 minutos), posteriormente incubadas em álcool 70% (30 segundos) e enxaguadas em água destilada autoclavada. Em seguida, as amostras foram cortadas em fragmentos de cerca de 1cm<sup>2</sup> e colocadas em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina e incubadas em BOD a 28°C por 7 dias. Um controle negativo foi realizado com a água do último enxágue. Verificou-se a taxa de colonização dos fungos, obtendo o valor de 100%. Nas placas de controle não houve crescimento de microrganismos, indicando que o processo de desinfecção superficial foi eficiente. Os resultados obtidos indicam a presença de uma comunidade endofítica no interior das porções jovens do caule de *S. terebinthifolius*. Estudos complementares podem ser realizados para verificar as possíveis propriedades dos fungos isolados e a identificação das espécies pode ser obtida por análises moleculares.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METABÓLITO SECUNDÁRIO DE UM FUNGO  
ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Trichilia elegans* CONTRA *Escherichia coli***

**André Hitoshi Assakura, Ravelly Casarotti Orlandelli, Vânia Specian,  
Sandro Augusto Rhoden, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana,  
Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº. 5790, Maringá (PR), Cep:  
87020-900. e-mail: assakura\_andre@hotmail.com

Fungos endofíticos, vivem no interior de plantas sadias; e são capazes de produzir metabólitos secundários idênticos ou similares aos metabólitos produzidos pelos vegetais hospedeiros. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do fungo endofítico (3-10.1.2), isolado de *Trichilia elegans* (Meliaceae) na produção de metabólito secundário com atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*. O endófito foi cultivado em meio BD (Batata-Dextrose), em erlenmeyer, a 28°C em BOD. Após 15 dias, o meio fermentado foi filtrado e centrifugado e o sobrenadante coletado foi transferido para um funil de separação e a ele adicionou-se o mesmo volume de acetato de etila. O funil foi agitado e, após 10 minutos, ocorreu separação das fases. O processo foi repetido por mais duas vezes e o acetato de etila obtido na extração, contendo o metabólito produzido pelo fungo, foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C. O material resultante da evaporação foi ressuspensionado em metanol absoluto. Para a avaliação da atividade antibacteriana, os testes foram feitos em triplicata: Em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani) sólido foi semeada a bactéria *E. coli* (ATCC 8739). Cada placa recebeu quatro discos de papel filtro Whatman nº 4 esterilizados (Ø 6 mm), equidistantes, inoculados com o metabólito produzido pelo endófito. Utilizou-se como controle positivo o antibiótico Tetraciclina e, como controles negativos utilizaram-se água destilada autoclavada e metanol absoluto na mesma proporção. As placas foram incubadas em BOD a 37°C por 24 horas. Os resultados mostraram que o metabólito extraído do fungo endofítico (3-10.1.2) é capaz de inibir o crescimento de *E. coli*, com formação de um halo de inibição sobre o patógeno, em relação aos controles negativos. Conclui-se que o isolado endofítico testado é promissor na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos contra *E. coli* e possui potencial biotecnológico para a indústria farmacêutica.

## **TOLERÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MEIO CONTENDO ÁGUA GLICERINADA (GLICEROL)**

**Pedro Paulo Lachner Violato, Ravelly Casarotti Orlandelli, Antonio Cláudio Leme,  
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep: 87020-900. e-mail: pedrinho\_lachner@yahoo.com.br

Microorganismos endofíticos são geralmente fungos e bactérias que vivem sistematicamente no interior das plantas sadias sem causar aparente dano aos seus hospedeiros, e alguns podem ser empregados como biorremediadores no tratamento de resíduos contaminantes industriais. A água glicerizada (glicerol) é um resíduo industrial obtido pela reação do óleo vegetal para a produção de biodiesel, após a extração do ácido graxo que existe na glicerina em forma bruta, resultando assim em um resíduo denominado água glicerizada. O objetivo desse trabalho foi verificar o crescimento de fungos endofíticos (ainda não identificados) isolados de *Piper hispidum* (jaborandi ou falso-jaborandi) e *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar) e fungos endofíticos do gênero *Fusarium* isolados de *Zea mays* (milho) em meio de cultura contendo água glicerizada. Os isolados G31-31, G01-40, G32-128, G02-92 (de *P. hispidum*), 012, 008, 016, (de *Saccharum* spp), *Fusarium* 25 e *Fusarium* A3 foram repicados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e em meio BDA suplementado com água glicerizada (glicerol) e incubados a 28°C em BOD por 7 dias. Após esse período, foi comparado o crescimento dos fungos na ausência e na presença de água glicerizada. Os isolados cresceram em ambos os meios, mostrando a tolerância desses endófitos à presença da água glicerizada. Os isolados G31-87, G32-128 e *Fusarium* A3 se destacaram quanto ao crescimento em meio contendo água glicerizada. Estes resultados indicam que os isolados testados são tolerantes à água glicerizada, indicando ainda o potencial biotecnológico destes fungos endofíticos na biorremediação.

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE SEGMENTOS  
CAULINARES DE *Murraya paniculata* (RUTACEAE) COM ATIVIDADE  
ANTAGONÍSTICA *IN VITRO* CONTRA O FITOPATÓGENO *Guinardia citricarpa***

**Bruna Manuelli Teles Moreira, Mayra Cristina de Araújo, Vera Lúcia Delmônico  
Vilela, Ravelly Casarotti Orlandelli, João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), Cep: 87020-900. e-mail: brunamanuelli@yahoo.com.br

Fungos endofíticos colonizam os espaços intra e intercelulares dos tecidos vegetais sem causar danos à planta hospedeira. São úteis na indústria alimentícia e farmacêutica, servem como vetores para introdução de genes de interesse em plantas e, ainda, são agentes inibidores de pragas e patógenos. Conhecida como murta-de-cheiro, *Murraya paniculata* (Rutaceae) é considerada como planta medicinal nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, China e Indonésia. As folhas são utilizadas para o tratamento de problemas intestinais, e também apresentam atividade antibiótica. Além disso, as raízes e folhas são usadas no tratamento de reumatismo e tosse. *Guinardia citricarpa* causa a Mancha Preta dos Citros, o que causa grandes prejuízos aos citricultores. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de endófitos de segmentos caulinares de *M. paniculata* no controle do fungo fitopatogênico *G. citricarpa*. A atividade antagonística de dois endófitos foi testada em experimentos com cultura dupla em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Foram inoculados, em cada placa, o fungo endofítico isolado e o fitopatógeno a ser testado, em pólos opostos, equidistantes. Cada combinação de endófito/patógeno foi repetida 3 vezes, bem como os controles negativos: o primeiro apenas com o fitopatógeno em um pólo da placa e o segundo, com o fitopatógeno nos dois pólos. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A caracterização do efeito do endofítico sobre o crescimento da colônia do fitopatógeno foi realizada observando-se o antagonismo, de acordo com a escala de Badalyan (2002). O isolado 1, testado, apresentou interação do tipo A, deadlock com contato micelial, e um índice de antagonismo de 16,24%. Já a interação do isolado 2 foi CA1, com deadlock inicial com contato micelial, havendo posteriormente uma sobreposição parcial do endófito sobre o fitopatógeno, apresentando um índice de antagonismo de 42,27%. Estes resultados indicam que fungos endofíticos isolados de segmentos caulinares de *M. paniculata* apresentam potencial biotecnológico no controle do fitopatógeno *G. citricarpa*.

Apoio: Laboratório de Biotecnologia Microbiana.