



OBTENÇÃO DE METABÓLITOS DO FUNGO ENDOFÍTICO 3-10.1.2 ISOLADO DE *Trichilia elegans* E SEU USO POTENCIAL NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

**André Hitoshi Assakura¹; Ravelly Casarotti Orlandelli², Raiani Nascimento Alberto¹,
Sandro Augusto Rhoden³, João Alencar Pamphile⁴**

RESUMO: Microrganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. São distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Fungos endofíticos representam um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico e podem ser isolados de diversas plantas medicinais, como *Trichilia elegans*. Esta planta pertence à família Meliaceae, conhecida popularmente como pau-de-ervilha. Nas linhagens de *Trichilia* sp. foi observada uma atividade anti-inflamatória, antiviral e antireumática de preparados de seus tecidos. Fungos fitopatógenos causam vários danos a diversas culturas, como os fungos do gênero *Colletotrichum*, que causam a antracnose em pimenta, tomate, soja, manga, mamão entre outros, e *Moniliophthora perniciosa*, fitopatógeno causador da doença conhecida como vassoura-de-bruxa no cacauzeiro. Este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de metabólitos do isolado endofítico 3-10.1.2 isolado de *Trichilia elegans* e a análise do seu uso potencial no controle e inibição do crescimento dos fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Moniliophthora perniciosa*. Os metabólitos foram extraídos de meio batata-dextrose fermentado durante 15 dias pelo endófito, empregando-se o solvente acetato de etila. Os resultados obtidos mostram que este isolado foi efetivo na inibição do crescimento de *Moniliophthora perniciosa*, mostrando que este fungo possui potencial para o uso no controle biológico dessa praga.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia; Controle de pragas; Fungos endofíticos; Metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos ou endófitos são aqueles que vivem no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais. Foi Bary, em 1866, quem delineou a diferença entre fungos endofíticos e fungos fitopatógenos, fazendo assim, a primeira referência aos fungos endofíticos. Porém, só ao final dos anos 70, estes fungos adquiriram importância e verificou-se que eles apresentam interações simbióticas com o vegetal hospedeiro, protegendo-o do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO, 1999).

¹ Acadêmicos do curso de Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. assakura_andre@hotmail.com; raiani_mica@hotmail.com

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. ravelycasarotti@gmail.com

³ Mestre em Biologia Comparada. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. sandrobiologo@uol.com.br

⁴ Docente da Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia Celular e Genética. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. japamphile@uem.br

Plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas estão sendo cada vez mais analisadas a partir de pressupostos de sua interação com microrganismos endofíticos, os quais têm apresentado diversos benefícios como produtores de antibióticos, metabólitos secundários de interesse farmacológico (PILLEGGI et al., 2002). Estudos demonstram que fungos endofíticos possuem diversas aplicações biotecnológicas, sendo capazes de produzir metabólitos secundários potencialmente bioativos idênticos ou similares aos metabólitos produzidos pelos vegetais hospedeiros. Os metabólitos podem inibir uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, incluindo fungos fitopatogênicos (AZEVEDO, 1998).

Sabendo-se dos efeitos diretos e indiretos dos pesticidas na saúde pública e no ambiente em geral, novas formas de controle de pragas, que sejam mais econômicas e menos danosas ao ecossistema, estão sendo pesquisadas. No caso específico do controle de pragas, alternativas biológicas incluem a utilização de bactérias, fungos, vírus e até substâncias produzidas pelo próprio inseto. Sendo assim, os fungos endofíticos representam um impacto no controle de pragas por proporcionar, à planta, certa resistência a ambientes com intenso estresse, de origem climática ou biológica. Normalmente essa resistência está ligada à produção, a partir dos endófitos, de compostos tóxicos aos herbívoros ou aos patógenos. Os fungos endofíticos habitam um nicho ecológico bastante semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, permitindo assim, controlá-los por competição, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo o vegetal a desenvolver resistência à doença (AZEVEDO et al., 2002).

Trichilia elegans Adr. Juss. ssp. *elegans* pertencente à família Meliaceae, é uma árvore conhecida popularmente como pau-de-ervilha. Espécies do gênero *Trichilia* apresentam uma atividade anti-inflamatória, antiviral e antirreumática (COULOMBIÉ et al., 1992).

O fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa* (Stahel Singer), anteriormente denominado *Crinipellis perniciosa*, é o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.), a qual se constitui na principal limitação para a produção de cacau na América do Sul, Panamá e nas ilhas do Caribe (THOROLD, 1975). Os fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum sp* causam antracnose em um grande número de plantas cultivadas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde há predominância de clima quente e úmido.

Este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de metabólitos secundários de um fungo endofítico (3-10.1.2) isolado de *Trichilia elegans* e a análise do seu uso potencial no controle e inibição do crescimento dos fitopatógenos *Colletotrichum sp.* e *Moniliophthora perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o fungo endofítico 3-10.1.2 isolado de folhas da planta medicinal *Trichilia elegans*, do estoque do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá. Os meios de cultura utilizados foram os meios BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e BD (Batata-Dextrose). O fungo foi repicado em placas de Petri com meio BDA e incubado em BOD a 28° C por 7 dias, para a obtenção de colônias jovens.

Para obtenção de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia de Li et al. (2005), modificada: os fungos foram incubados em meio BD (Batata-Dextrose), em erlenmeyer, em BOD a 28° C por 15 dias. O meio fermentado obtido foi filtrado e centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então colocado em um funil de separação e o mesmo volume de acetato de etila P.A foi adicionado. O funil foi agitado e as fases foram separadas. O processo foi repetido mais duas vezes. O acetato de etila resultante da extração foi concentrado em evaporador rotativo Marconi MA 120, a

50° C. O material resultante da evaporação foi diluído com 1 mL de metanol absoluto e estocado a 4° C.

A atividade antifúngica do isolado 3-10.1.2 foi testada utilizando-se ensaios biológicos qualitativos, em triplicata. Os fungos utilizados no teste foram os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum sp.* e *Moniliophthora perniciosa*.

Para a análise de inibição dos fitopatógenos, estes fungos foram crescidos em meio BDA por 7 dias a 28° C, para a obtenção de colônias jovens. Em seguida, foi preparada uma solução de conídios em solução salina a 0,85% e em câmara de Neubauer foram contados os conídios. A suspensão foi diluída até conter em torno de 10⁶ conídios por mL. Foram inoculados em placas de Petri 100 µL da solução de conídios e espalhados com alça de Drigalsky. Foram colocados nas placas de Petri, 4 discos de papel Whatman n° 4 esterilizados (Ø 6 mm), equidistantes, inoculados com 10 µL do metabólito. As placas permaneceram incubadas a 28° C por 7 dias. O controle positivo foi realizado utilizando-se o fungicida Derosal plus®, com diluição de 1⁻¹, onde cada placa de Petri recebeu também 4 discos e papel filtro contendo 10 µL de fungicida. Para o controle negativo, foram utilizados água destilada autoclavada e metanol absoluto, nas mesmas condições. Após 7 dias foi avaliada a atividade antimicrobiana pela formação e medida do halo de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 7 dias, foi observada a presença do halo de inibição gerado pelo metabólito do isolado 3-10.1.2 apenas no teste contra o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, mostrando que o metabólito secundário produzido por este fungo foi efetivo na inibição de crescimento deste fitopatógeno. Enquanto que nos teste realizados contra o fitopatógeno *Colletotrichum sp* não houve inibição pelo metabólito secundário do endófito. Similarmente, Crozier et al. (2006), trabalhando com endófitos isolados de cacau, verificaram também que os metabólitos produzidos por esses fungos endofíticos apresentaram ação contra os patógenos *M. rozeri* e *M. perniciosa*.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o fungo endofítico 3-10.1.2, isolado da planta medicinal *T. elegans*, é promissor na produção de metabólitos secundários para a inibição do crescimento de *M. perniciosa*, já para a inibição de fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, o metabólito não mostrou ser eficiente. Assim, conclui-se que o metabólito deste isolado possui potencial para a utilização no controle biológico da praga *M. perniciosa*.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELLO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998, p. 117-137.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2 (supl.), p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A. et al. (Org.). **Biotechnologia avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 235-268.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, v. 2, p. 165-194, 2002.

COULOMBIÉ, F. C.; ANDREI, G. M.; LAGUENS, R. P.; TORRES, R. A.; COTO, C. E. Partially purified leaf extracts of *Melia azedarach* L. inhibit Tacaribe virus growth in neonatal mice. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 1, p. 15-19, 1992.

CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; AIME, M. C.; EVANS, H. C.; HOLMES, K. A. Molecular characterization of fungal entophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 783-791, 2006.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515–1519, 2005.

PILEGGI, M.; RAIMAN, M. P.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V. Ação Antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale* L. **Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences**. Ponta Grossa, v. 8 n.1, p. 47-55, 2002.

THOROLD, C. A. **Diseases of Cocoa**. Oxford: Claredon Press, 1975. 423 p.