



OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Piper hispidum* Sw. COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA *Staphylococcus aureus*

*Ravelly Casarotti Orlandelli*¹; *Raiani Nascimento Alberto*²; *Angela Kwiatkowski*³; *João Alencar Pamphile*⁴

RESUMO: Endófitos ou fungos endofíticos habitam o interior das plantas sem causar-lhes danos, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Os pressupostos da interação endófito-planta hospedeira sugerem que as propriedades terapêuticas podem estar no endófito e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos; por isso é crescente o interesse por endófitos de plantas medicinais. A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é encontrada na microbiota normal do ser humano, porém é uma das bactérias patogênicas mais importantes, já que atua como agente de várias infecções, incluindo doenças respiratórias e cardíacas e também infecções hospitalares. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de metabólitos secundários de quatro fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* (falso-jaborandi) e a avaliação da ação antibacteriana dos mesmos contra *S. aureus*. Os metabólitos foram testados pela técnica *cup plate*, onde o resultado positivo foi indicado pela formação de halos de inibição. As médias obtidas para os halos foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os metabólitos testados apresentaram ação contra a bactéria, com halos de inibição que variaram entre 2,67 e 12,42 mm. O metabólito mais efetivo foi o produzido pelo fungo endofítico G20-20. Conclui-se então que este fungo demonstrou ser o mais promissor para a indústria farmacêutica, para atuar no controle da bactéria *S. aureus*.

PALAVRAS-CHAVE: Bactéria patogênica; Endófitos; Metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

De modo geral são considerados endófitos ou microrganismos endofíticos os fungos e as bactérias que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Esses microrganismos não causam danos aos seus hospedeiros, ao contrário, os beneficiam atuando como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, insetos-pragas e herbívoros (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. ravelycasarotti@gmail.com

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. raiani_mica@hotmail.com

³Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. angelak.k@gmail.com

⁴Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. prof.pamphile@gmail.com

Há um grande interesse pelos estudos de endófitos de plantas medicinais, a fim de se descobrir novos compostos, já que os pressupostos da interação endófito-hospedeiro sugerem que as propriedades terapêuticas podem estar no endófito e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos (GOMES-FIGUEIREDO, 2006).

Fármacos de alto valor agregado podem ser produzidos a partir de microrganismos endofíticos extraídos de uma pequena porção de tecido vegetal, mantendo assim a produção de compostos que garantam a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças. Visto que muitas plantas medicinais estão ameaçadas de extinção devido ao extrativismo predatório, a busca de endófitos com potencial farmacológico adquire também importância ecológica (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; PRINCE, 2008).

O hábito da automedicação e o uso excessivo de antibióticos acarretam a seleção de cepas de bactérias resistentes, sendo importante a constante busca de novos medicamentos. Pesquisas têm demonstrado que fungos endofíticos podem sintetizar produtos bioativos potencialmente úteis para a medicina (STROBEL, 2003).

Apesar de encontrada com relativa frequência na microbiota normal do ser humano, *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de várias infecções, desde as superficiais até algumas disseminadas com elevada gravidade (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Esta bactéria Gram-positiva é causadora de doenças respiratórias e cardíacas e também infecções hospitalares (SOUZA et al., 2004). Embora exista uma grande variedade de quadros clínicos causados por *S. aureus*, estes podem ser divididos em três principais tipos: 1) infecções superficiais, como abscessos subcutâneos e as infecções de feridas; 2) infecções sistêmicas, tais como bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite, miosite tropical e pneumonia; 3) quadros tóxicos, incluindo a síndrome do choque tóxico, a síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de metabólitos secundários de quatro fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* (falso-jaborandi) e a avaliação da ação antibacteriana contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro fungos endofíticos (G20-20, G65-65, G33-73 e G53-83) isolados de *P. hispidum* e pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá. A bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá. Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram: meio BDA (Batata Dextrose Ágar), caldo BD (Batata Dextrose), meio LB (Luria Bertani) e caldo LB.

As extrações dos metabólitos secundários foram realizadas segundo Phongpaichit et al. (2007), com modificações. Os fungos endofíticos foram inicialmente crescidos em meio BDA por 7 dias. Três fragmentos (5 mm²) de cada isolado endofítico foram inoculados em Erlenmeyers contendo 250 mL de caldo BD e incubados em B.O.D. a 28°C por 15 dias. Em seguida, os meios fermentados foram filtrados e centrifugados a 3.600 rpm por 20 min para a separação do micélio. Os meios e igual volume de acetato de etila P.A. foram transferidos para um funil de separação e agitados. Após 10 minutos, ocorreu a separação das fases por diferença de polaridade. O processo foi repetido mais duas vezes. O acetato de etila contendo os metabólitos fúngicos foi coletado e concentrado 98% em evaporador rotativo R-3000 Büchi a 40°C e os produtos finais foram ressuspensos em álcool metílico P.A. e preservados a 4°C.

Para a avaliação da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica *cup plate*: a bactéria patogênica *S. aureus* foi crescida a 37°C por 24 h em meio LB (Luria Bertani) e em seguida crescida em caldo LB e ajustada a uma concentração de 10⁶ células/mL. A

bactéria foi semeada com alça de Drigalsky (100 µL) em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB. Em cada placa foram colocados 4 discos (6 mm) estéreis de papel filtro Whatman nº 4, equidistantes, inoculados com 10 µL dos metabólitos endofíticos. Nos controles negativos, os discos foram inoculados com a mesma quantidade de água destilada autoclavada e álcool metílico P.A. e no controle positivo, com o antibiótico Tetraciclina na mesma concentração dos metabólitos a serem testados.

Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas em B.O.D. a 37°C por 24 h. Avaliou-se a atividade antibacteriana pela formação de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em mm.

As medidas obtidas foram avaliadas estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico SAS (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos metabólitos secundários com as seguintes concentrações: 61,4 mg/mL (a partir do isolado G20-20), 50,1 mg/mL (a partir do isolado G65-65), 19,9 mg/mL (a partir do isolado G33-73) e 24 mg/mL (a partir do isolado G53-83).

Todos os metabólitos apresentaram ação contra a bactéria testada, com halos de inibição variando entre 2,67 e 12,42 mm. Os valores obtidos para os tratamentos com metabólitos secundários e controles, bem como a análise estatística, podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antibacteriana dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos contra a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*.

Tratamentos/ Controles	Concentração (mg/mL)	Halos de inibição (em mm) (média ± desvio padrão)*
Metabólito do endófito G20-20	61,4	12,42±1,01 ^d
Metabólito do endófito G65-65	50,1	3,17±1,42 ^e
Metabólito do endófito G33-73	19,9	3,75±0,25 ^e
Metabólito do endófito G53-83	24,0	2,67±1,59 ^e
Controle positivo 1 (Tetraciclina)	61,4	34,00±0,00 ^a
Controle positivo 2 (Tetraciclina)	50,1	33,58±0,14 ^{ab}
Controle positivo 3 (Tetraciclina)	19,9	29,75±0,66 ^c
Controle positivo 4 (Tetraciclina)	24,0	32,25±0,25 ^b
Controle negativo 1 (Água destilada)	-	0,00±0,00 ^f
Controle negativo 2 (Álcool metílico)	-	0,00±0,00 ^f

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Semelhantemente, Souza et al. (2004) avaliaram os halos de inibição produzidos pelos metabólitos extracelulares de 19 fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia contra *S. aureus*. Como resultado, sete metabólitos produziram halos entre 10 e 18 mm, nove metabólitos produziram halos entre 20 e 23 mm e os metabólitos de três endofíticos não apresentaram ação antibacteriana.

Já Hormazabal e Piontelli (2009) mostraram que, entre os endófitos isolados de gimnospermas nativas do Chile, o metabólito produzido pelo fungo *Curvularia protuberata* teve o melhor efeito sobre *S. aureus*, com média de inibição do crescimento de 16 mm.

Ramasamy et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos produzidos por 348 fungos endofíticos de plantas medicinais da Malásia contra *S. aureus*. Os autores verificaram que 344 extratos apresentaram inibição com média de até 8 mm,

três extratos apresentaram inibição com média entre 10 e 15 mm e apenas um extrato apresentou inibição com média de 15 mm ou mais.

CONCLUSÃO

Entre os metabólitos testados, o mais efetivo foi o produzido pelo isolado endofítico G20-20, que apresentou halo médio de inibição de 12,42 mm. Assim, conclui-se que este isolado produz metabólitos secundários com potencial para a inibição de *S. aureus*, podendo ser útil futuramente na indústria farmacêutica para o controle desta bactéria patogênica.

REFERÊNCIAS

GOMES-FIGUEIREDO, J. A. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** 2006. 136 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HORMAZABAL, E.; PIONTELLI, E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 813-819, 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PHONGPAICHIT, S.; NIKOM J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KIRTIKARA, K.; Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 517-525, 2009.

PRINCE, K. A. **Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA.** 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; BAKAR, H. A.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. S.; ALI, M. F.; WEBER, J. F. F.; COLE, A. L. J. Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 640-643, 2010.

SAS. **Statistical Analysis System.** SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780 p.