

AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS DE ISOLADO ENDOFÍTICO DE *Sapindus saponaria* NO CONTROLE DE PATÓGENOS.

**Raiani Nascimento Alberto¹; Ravelly Casarotti Orlandelli²; Adriana Garcia³;
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. A distinção, no caso, é feita apenas para não incluir as bactérias fixadoras de nitrogênio entre os endófitos que vivem em simbiose com as plantas formando nódulos além dos fungos micorrízicos. Por meio de análises ecológicas de uma gama de espécies hospedeiras, fica aparente que fungos endofíticos compreendem um nicho e complexo ecológico distinto de parasitas obrigatórios e saprófitas. *Sapindus saponaria* L. pertence à família Sapindaceae, é uma árvore conhecida popularmente como sabão-de-soldado, na medicina popular a casca, a raiz e o fruto são utilizados como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue e contra a tosse. Suas folhas apresentam propriedades neutralizadoras de hemorragia. Este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de metabólitos do fungo endofítico *Curvularia* sp. isolado de *Sapindus saponaria* e a análise do seu uso potencial no controle contra patógenos. Os metabólitos foram extraídos, empregando-se o solvente acetato de etila, de meio batata-dextrose fermentado pelo endófito durante 15 dias. Os resultados obtidos mostram que *Curvularia affinis* foi efetivo na inibição do crescimento de *Escherichia coli*, mostrando que este fungo possui potencial para o uso no controle deste patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia; Controle de patógenos; Endofíticos; Metabólitos.

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos ou endófitos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior de plantas saudáveis, geralmente habitando partes aéreas como folhas e caules. Os fungos endofíticos não causam aparente dano a suas plantas hospedeiras, distinguindo-se dos fungos patogênicos (que causam doenças em plantas) e dos fungos epifíticos (que vivem na superfície dos vegetais). Uma mesma planta pode albergar várias espécies de fungos, sendo as mais frequentes consideradas dominantes e as demais, secundárias (AZEVEDO, 2002). Um microrganismo endofítico pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um certo período, causando ou não danos a mesma. A primeira referência aos fungos endofíticos foi por Bary, em 1866, que considerou endofíticos os fungos que vivem no

¹ Acadêmica do curso de Graduação em Ciências Biológicas. Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. raiani_mica@hotmail.com

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. ravellycasarotti@hotmail.com

³ Mestre em Biologia Comparada, Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. adri-aninha@hotmail.com

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

interior dos tecidos das plantas e epifíticos os fungos que vivem sobre a superfície do seu hospedeiro. (AZEVEDO, 1999).

Atualmente, as plantas medicinais vêm sendo estudadas a partir de pressupostos de interações endofíticas, as quais tem apresentado muitos benefícios, como produtores de antibióticos, metabolitos secundários de interesse farmacológico, bioindicadores de vitalidade, agente de controle biológico de pragas e doenças entre outros. (PILLEGGI *et al.*, 2002).

Sapindus saponaria L. pertence à família Sapindaceae, é uma árvore conhecida popularmente como sabão-de-soldado. Sua casca, raiz e o fruto são utilizados na medicina popular como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue e contra a tosse (LORENZI, 2004).

Sabendo dos efeitos diretos e indiretos dos pesticidas na saúde pública e no ambiente em geral, tem demandado novas formas de controle de pragas que sejam mais econômicas e menos danosas ao ecossistema. No caso específico do controle de pragas, alternativas biológicas incluem a utilização de bactérias, fungos, vírus e até substâncias produzidas pelo próprio inseto.

Os endófitos 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. Portanto, esses microrganismos 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 se deve à produção de compostos tóxicos aos herbívoros ou aos patógenos (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Escherichia coli é uma bactéria de grande diversidade patogênica. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente chamadas de *E. coli* diarreiogênica e as associadas a infecções extra-intestinais de EXPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*). Este bastonete Gram-negativo é também membro da microbiota intestinal do homem, sendo encontrada nas fezes de todos os indivíduos normais. Embora 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. Apesar da grande variedade de quadros clínicos causados por *S. aureus*, estes podem ser divididos em três principais tipos: as infecções superficiais, como abscessos subcutâneos e as infecções de feridas; as infecções sistêmicas, tais como bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite, miosite tropical e pneumonia; e, os quadros tóxicos, incluindo a síndrome do choque tóxico, a síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar (TRABULSI; ALTERTHUM. 2008)

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. O fungo *Alternaria alternata*, também um fitopatógeno, é o causador da mancha marrom em tangerina e tomate, sendo uma importante praga dessas culturas.

Este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de metabólitos do fungo endofítico *Curvularia sp.* isolado de *Sapindus saponaria* e a análise do seu uso potencial no controle contra patógenos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o fungo endofítico *Curvularia sp.*, isolado de *Sapindus saponaria*, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá. Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram os meios BDA (Batata-

Dextrose-Ágar), BD (Batata-Dextrose), meios LB (Luria Bertani) e LB líquido. Para obtenção de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia de Li *et al.* (2005), modificada.

O fungo foi incubado em meio BDA por 7 dias para a obtenção de colônias jovens. Em seguida, o fungo foi incubado em meio BD, em erlenmeyer a 28° C por 15 dias em BOD. O meio fermentado obtido foi centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido a 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. A extração foi repetida mais duas vezes e o acetato de etila resultante da extração foi concentrado em evaporador rotativo a 40° C. O material resultante da evaporação foi diluído com 1 mL de etanol absoluto e estocado a 4° C.

A atividade antifúngica foi testada utilizando ensaios biológicos qualitativos, em triplicata. Os microrganismos utilizados foram os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum sp.*, e as bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Para a análise utilizando as bactérias foi realizada a técnica de difusão em disco a partir da obtenção do líquido metabólito dos isolados endofíticos. As bactérias teste cresceram por 24 horas em meio LB líquido, ajustadas a uma concentração de 10⁶ células por mL, utilizando como controle positivo o antibiótico Tetraciclina (0,5 µL/mL em etanol absoluto). As bactérias foram inoculados (100 µL) sobre placas de Petri contendo meio LB realizando-se o espalhamento com alça de Drigalsky. Posteriormente foram colocados 4 discos papel Whatman n° 4 estéreis (Ø 6 mm), eqüidistantes, inoculados com 10 µL do líquido metabólico. As placas permaneceram incubadas a 37° C durante 24 horas. Foi avaliada a atividade antimicrobiana pela formação e medida do halo de inibição.

Para a análise de inibição dos fitopatógenos, os fungos cresceram em meio BDA por 7 dias a 28° C e foi então preparada uma solução de esporos em solução salina a 0,85% e em câmara de Neubauer foram contados os esporos e a suspensão será diluída até conter em torno de 10⁶ esporos por mL. Foram inoculados 100 µL da solução de esporos em placas de Petri, e será realizado o espalhamento com alça de Drigalsky. O controle positivo foi feito utilizando o fungicida Derosal plus®, com diluição de 1⁻¹. Posteriormente foram colocados 4 discos papel Whatman n° 4 estéreis (Ø 6 mm), eqüidistantes, inoculados com 10 µL do líquido metabólito. As placas permaneceram incubadas a 28°C por 7 dias. Foi avaliada a atividade antimicrobiana pela formação e medida do halo de inibição, adaptado de Li (2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24 horas foi observada a presença do halo de inibição gerado pelo metabólito de *Curvularia affinis* extraído de *S. saponaria* apenas no teste contra bactéria *E. coli*, mostrando que o metabólito secundário produzido por este fungo foi efetivo na inibição de crescimento deste patógeno. Similarmente, Sette *et al.* (2006), trabalhando com endófitos isolados de plantas do café, também verificaram que os metabólitos produzidos por esses fungos endofíticos apresentaram ação contra *E. coli*. Porém, esses autores também obtiveram resultados com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Nos testes realizados contra *Colletotrichum sp.*, *A. alternata* e *S. aureus* não houve inibição pelo metabólito secundário do endófito.

4 CONCLUSÃO

Estes testes mostram que o metabólito extraído do endófito *C. affinis* (Ss32) foi efetivo na inibição de crescimento de *E.coli*, mas não mostrou efeito nenhum na inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* e dos fungos *Alternaria alternata* e

Colletotrichum sp. Conclui-se então que este isolado produz metabólitos secundários com potencial biotecnológico para o controle de *E. coli*, podendo ser utilizado na indústria farmacêutica para inibição do crescimento da mesma.

REFERÊNCIAS

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.; MACCHERONI Jr., W.; ARAUJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicias. In: SERAFINI, L. A. *et al.* (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 235-268.

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.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 4 ed. São Paulo: Editora Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2004.

PAMPFILE, J. A. **Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.)**. 1997. 199 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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**, v. 8 n.1, p. 47-55, 2002.

SETTE, L.D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELENA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and microbial activity of endophytic fungi from coffee plants. **Springer Science**, v. 22, n. 11, p. 1185-1195, 2006.

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