



AÇÃO ANTIBACTERIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Piper hispidum* Sw. CONTRA *Micrococcus luteus*

*Ravelly Casarotti Orlandelli*¹; *Raiani Nascimento Alberto*²; *Angela Kwiatkowski*³; *João Lúcio de Azevedo*⁴; *João Alencar Pamphile*⁵

RESUMO: Uma única planta sadia pode abrigar uma diversidade de fungos endofíticos em seu interior. Esses fungos possuem diversas aplicações biotecnológicas, e podem ser capazes de produzir metabólitos secundários bioativos idênticos ou similares aos produzidos por vegetais. Esses metabólitos podem inibir uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, como fungos fitopatogênicos, bactérias, vírus e protozoários. A bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* é encontrada no meio ambiente e às vezes, transitoriamente na pele do ser humano. É comumente utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos e pode estar associada à ocorrência de algumas infecções em humanos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por quatro fungos endofíticos isolados da planta *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi) contra *M. luteus*. 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 3,83 e 14,08 mm. O metabólito mais efetivo foi o produzido pelo fungo endofítico G20-20, que demonstrou ser o mais promissor para a indústria farmacêutica, para atuar no controle da bactéria testada neste trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: Controle bacteriano; Endófitos; Metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

Alguns fungos habitam o interior das plantas, sendo encontrados em seus órgãos e tecidos, como folhas e ramos. Esses fungos, chamados endófitos ou endofíticos, não causam danos às plantas hospedeiras e as beneficiam combatendo microrganismos fitopatogênicos, insetos-pragas e herbívoros. Uma mesma planta pode albergar várias

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_na@hotmail.com

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

⁴Pesquisador Visitante Nível 1 do CNPq junto ao Departamento de Biologia Celular e Genética (DBC) – Universidade Estadual de Maringá (UEM). jazevedo@esalq.usp.br

⁵Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. prof.pamphile@gmail.com

espécies de fungos endofíticos, sendo as mais frequentes consideradas dominantes e as demais, secundárias (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Estudos demonstram que fungos endofíticos possuem diversas aplicações biotecnológicas, sendo capazes de produzir metabólitos secundários bioativos idênticos ou similares aos metabólitos produzidos pelos vegetais hospedeiros. Os metabólitos podem inibir uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, como fungos fitopatogênicos, bactérias, vírus e protozoários que afetam plantas e animais, incluindo os seres humanos. Diferentes produtos de valor econômico têm sido obtidos a partir de endófitos: fármacos, sobretudo novos antibióticos, produtos anticancerígenos e imunossuppressores (AZEVEDO, 1998).

O gênero *Micrococcus* é composto por bactérias Gram-positivas das espécies *Micrococcus luteus* e *Micrococcus lylae*. *M. luteus* é uma bactéria do meio ambiente às vezes encontrada transitoriamente na pele do ser humano. É comumente utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos e pode estar associada à ocorrência de infecções como abscessos, pneumonia, artrite séptica, meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunodeprimidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados da planta *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi) contra *Micrococcus luteus*.

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 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 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 *M. luteus* 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 horas. 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

Os metabólitos secundários obtidos apresentaram concentrações que variaram entre 19,9 mg/mL e 61,4 mg/mL. Todos os metabólitos apresentaram ação contra a bactéria testada, com halos de inibição variando entre 3,83 e 14,08 mm. Os resultados, 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 *Micrococcus luteus*.

Tratamentos/ Controles	Concentração (mg/mL)	Halos de inibição (em mm) (média \pm desvio padrão)*
Metabólito do endófito G20-20	61,4	14,08 \pm 1,70 ^b
Metabólito do endófito G65-65	50,1	3,83 \pm 1,77 ^c
Metabólito do endófito G33-73	19,9	5,25 \pm 1,09 ^c
Metabólito do endófito G53-83	24,0	5,08 \pm 0,76 ^c
Controle positivo 1 (Tetraciclina)	61,4	39,50 \pm 0,25 ^a
Controle positivo 2 (Tetraciclina)	50,1	39,25 \pm 0,00 ^a
Controle positivo 3 (Tetraciclina)	19,9	39,00 \pm 0,00 ^a
Controle positivo 4 (Tetraciclina)	24,0	39,25 \pm 0,25 ^a
Controle negativo 1 (Água destilada)	-	0,00 \pm 0,00 ^d
Controle negativo 2 (Álcool metílico)	-	0,00 \pm 0,00 ^d

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

Gomes-Figueiredo (2006) avaliou a atividade antibacteriana de extratos produzidos por 13 fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis* isolados da planta medicinal *Maytenus ilicifolia*. Dois endófitos foram capazes de produzir zonas de inibição contra *M. luteus*, com diâmetros entre 4 e 5 mm. Um terceiro isolado apresentou apenas traços de inibição.

Os metabólitos de 36 fungos endofíticos isolados de gimnospermas nativas do Chile foram testados por Hormazabal e Piontelli (2009) contra *M. luteus*. Os metabólitos de vinte e três fungos apresentaram resultado positivo, com zonas de inibição entre 7 e 10 mm.

Já Ramasamy et al. (2010) avaliaram a ação de extratos metabólicos de 348 fungos endofíticos isolados de plantas medicinais da Malásia. Como resultado 343 apresentaram zonas de inibição menores que 8 mm, dois apresentaram zonas de inibição entre 8 e 10 mm, para outros dois as medidas variaram entre 10 e 15 mm e um único extrato fúngico apresentou zonas de inibição acima de 15 mm.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o metabólito mais efetivo foi o produzido pelo fungo endofítico G20-20, que apresentou halo médio de inibição de 14,08 mm. Isto demonstra que este isolado produz metabólitos secundários com potencial para o controle da bactéria *M. luteus*, que pode estar associada à ocorrência de algumas doenças em seres humanos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.
- 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.
- 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.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. 780 p.