



EFEITO ANTIMICROBIANO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Curvularia* sp., ISOLADO ENDOFÍTICO DE *Sapindus saponaria*, CONTRA *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hira*

*Raiani Nascimento Alberto*¹; *Ravelly Casarotti Orlandelli*²; *Adriana Garcia*³; *Tiago Tognolli de Almeida*⁴; *João Alencar Pamphile*⁵

RESUMO: Endófitos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. *Sapindus saponaria* é uma árvore conhecida popularmente como sabão-de-soldado, geralmente utilizada na medicina popular. O objetivo principal desse trabalho foi a obtenção de metabólitos do fungo endofítico de *Sapindus saponaria* e a avaliação do seu uso potencial no controle de patógenos. Para a obtenção de metabólitos secundários foi realizada a partição em acetato de etila, do meio fermentado pelo endófito previamente, durante 15 dias. Foi utilizado o fungo endofítico *Curvularia affinis* isolado de *S. saponaria*. Testou-se os metabólitos obtidos contra *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*, obtendo-se resultados positivos de inibição, ação antimicrobiana, contra ambas. Conclui-se então que o isolado endofítico *Curvularia* sp. produz metabólitos secundários com potencial biotecnológico para o controle de *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*.

PALAVRAS-CHAVE: Endófito; Metabólitos; Biotecnologia; Antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

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. Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas hospedeiras pelas aberturas naturais como estômatos, lenticelas, área de emergência de raízes laterais, hidatódios, ferimentos, aberturas causadas por insetos e pela produção de enzimas. Foram inicialmente descritos por Bary em 1866 e até o final de 1970 foram considerados assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais a seus hospedeiros (Azevedo, 2002). Acredita-se que fungos endofíticos tenham co-evoluído com seus hospedeiros, constituindo uma íntima interação mutualística, onde a planta fornece

¹ Mestranda do Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Bolsista da CAPES; ²Doutoranda do Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Bolsista da CAPES

³ Doutoranda do Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR

⁴Graduando da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR

⁵Docente da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR. prof.pamphile@gmail.com

nutrientes e proteção aos microrganismos e estes conferem ao vegetal maior resistência a ambientes com intenso A partir desta interação, endófitos adquiriram a capacidade de produzir metabólitos de interesse farmacológico, idênticos ou semelhantes aos produzidos por vegetais. Metabólitos secundários obtidos a partir de fungos endofíticos apresentam, ainda utilidade terapêutica, pela produção de alguns compostos com atividade de hormônios, antibióticos, antitumorais entre outras funções biológicas, o que causam grande interesse industrial e biotecnológico. Devido ao fato de muitas espécies vegetais produtoras de substâncias de interesse farmacêutico estarem ameaçadas de extinção, os fungos endofíticos constituem uma promissora fonte de fármacos de alto valor agregado, sendo portanto, alvo de importantes pesquisas.

Algumas espécies do gênero *Curvularia* são conhecidas como saprófitas em diferentes substratos vegetais e no solo, podendo ainda serem isoladas a partir do solo e do ar. Outras são fitopatogênicas em gramíneas e em regiões de clima tropical e subtropical. Contudo, espécies de *Curvularia* podem ser encontradas endofiticamente em plantas medicinais, sem causar malefícios a estas plantas, pelo contrário, podendo ser úteis dentro e fora da planta hospedeira que os albergam (Lima, 2007). A utilização das plantas medicinais pela população como medicamento é bem antiga. Pesquisas mostram que cerca de 80% da população mundial já fez uso de plantas medicinais na busca da cura de alguma doença ou para amenizar alguma dor. Muitas pesquisas demonstram que algumas propriedades medicinais de certas plantas podem não ser somente produzidas pelas plantas, mas podem estar relacionadas com metabólitos que são produzidos por microrganismos endofíticos que essas plantas albergam. Vários são os exemplos de endófitos isolados de plantas medicinais, que produzem compostos com propriedades e emprego no uso medicinal.

Sapindus saponaria L., conhecida popularmente como “sabão-de-soldado”, saboeira, sabão-de-macaco, é espécie arbórea de distribuição regular nos estados das regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste (Albiero, 2001). Os seus frutos são utilizados pela população como sabão, no banho e no combate a úlceras, feridas na pele e inflamações. Espécies de *Sapindus* têm sido pesquisadas por suas propriedades tensoativas como também para uso farmacológico, pois esses compostos classificados como triterpenóides, apresentam atividade antiulcerativa e antineoplásica (Margu, 2002).

A bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* é comumente utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos. Trata-se de um microrganismo do meio ambiente, às vezes encontrado transitoriamente na pele do ser humano, que pode estar associado à ocorrência de infecções como abscessos, pneumonia, artrite séptica, meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunodeprimidos.

Enterococcus hirae é um exemplo de bactéria do tipo cocos Gram-positiva que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias e que apresentam reação em catalase negativa. São comensais e atuam como patógenos oportunistas, embora não causem respostas inflamatórias sistêmicas severas, como choque séptico. Frequentemente causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período e/ou que receberam múltipla terapia antimicrobiana. Normalmente colonizante do trato intestinal, os enterococos podem ser encontrados ainda, embora com menos frequência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina. Por muito tempo foram utilizados como indicadores de contaminação de água e de alimentos (Centikaya,2000).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado de *Sapindus saponaria*, na produção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*, utilizando-se de ensaios biológicos qualitativos em triplicata.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção do metabólito secundário foi utilizada a metodologia de Li *et al.* (2005), modificada. A linhagem endofítica *Curvularia* sp. (Ss32), isolada de folhas de *S. saponaria* e pertencente ao estoque do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá, foi repicada em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 7 dias, para a obtenção de colônias jovens. Em seguida, o fungo foi crescido em meio BD (Batata-Dextrose), em erlenmeyer, a 28° C. Após 15 dias, o meio fermentado foi filtrado e centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante coletado foi transferido para um funil de separação e a ele adicionou-se o mesmo volume de acetato de etila P.A. O funil foi fortemente agitado e, após 10 minutos, ocorreu separação das fases por diferença de polaridade. O processo foi repetido por mais duas vezes e o acetato de etila obtido na extração, contendo o metabólito produzido pelo fungo, foi concentrado 98% em evaporador rotativo a 40° C. O material resultante da evaporação, ressuspendido em metanol absoluto e estocado a 4° C até o momento da sua utilização. Para a avaliação da atividade antibacteriana, foi realizada a técnica de difusão em disco, a partir do metabólito secundário produzido pelo isolado endofítico. A bactéria *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Enterococcus hirae* (ATCC 1227) foram inoculadas em placas de Petri com meio LB (Luria Bertani) sólido, em BOD a 37° C por 24 horas, para a obtenção de colônias jovens. Em seguida, as colônias foram crescidas em meio LB líquido, a 37° C em BOD por 24 horas e ajustadas a uma concentração de 10⁶ células por mL. Os testes foram feitos em triplicata e as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido. Cada placa recebeu quatro discos de papel filtro Whatman n° 4 esterilizados (Ø 6 mm), equidistantes, inoculados com o extrato metabólito. Utilizou-se como controle positivo o antibiótico Tetraciclina (Sigma) (50 µg.mL⁻¹ em etanol absoluto) e para os controles negativos o metabólito foi substituído, na mesma proporção, por água destilada autoclavada e metanol absoluto. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o crescimento das colônias bacterianas em BOD por 24 horas, foi avaliada a atividade antimicrobiana pela formação do halo de inibição gerado pelo metabólito secundário. De acordo com os resultados obtidos, o metabólito extraído do fungo endofítico *Curvularia* sp. é capaz de inibir o crescimento de *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*, com formação de um discreto halo de inibição sobre a bactéria patogênica, em relação aos controles positivos e negativos. Uma melhor ação desse metabólito no controle e inibição de *M. luteus* e *E. hirae* pode ser obtida com uma otimização no processo de obtenção do metabólito secundário e análise de concentrações ideais do mesmo.

CONCLUSÃO

A inibição de crescimento de *M. luteus* e *E. hirae* pelos metabólitos bioativos de *Curvularia* sp. reforça o potencial biotecnológico de isolados endofíticos no controle de patógenos.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO JL, MACCHERONI Jr W, ARAÚJO WL, PEREIRA JO. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros, NM, Azevedo JL. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUSC. 2002; 235-268.

ALBIERO ALM, BACCHI EM, MOURÃO KSM. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiarum*. 2001; 23(2): 549-560.

CENTIKAYA Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13: 686-707.

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*. 2005; 21: 1515-1519.

LIMA A, Furtado M. Espécies do gênero *Curvularia* (Fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. *Portugaliae Acta Biologica*. 2007; 22:145-156.

MURGU M. Saponinas e glicosídeos de *Sapindus saponaria*: metodologias de análise por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos. 133 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Departamento de Química da UFSCar, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

PEIXOTO-NETO PAS, *et al.* Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2002; (29): 62-76.

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