



## **AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Escherichia coli* POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE QUATRO FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Piper hispidum* Sw**

*Ravelly Casarotti Orlandelli*<sup>1</sup>; *Angela Kwiatkowski*<sup>2</sup>; *João Lúcio de Azevedo*<sup>3</sup>; *João Alencar Pamphile*<sup>4</sup>

**RESUMO:** Fungos endofíticos ou endófitos vivem no interior de plantas saudáveis sem causar-lhes danos, geralmente habitando partes aéreas como folhas e caules. Esses fungos possuem diversas aplicações biotecnológicas, sendo 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 que afetam plantas e animais, incluindo os seres humanos. A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* habita normalmente o trato-intestinal dos animais, incluindo o homem, porém, algumas cepas dessas bactérias coletivamente chamadas de ECC (*E. coli* enteropatogênicas) são capazes de provocar doenças em indivíduos humanos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* por metabólitos secundários produzidos por quatro fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi). 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 3,08 e 9,42 mm. O metabólito mais efetivo foi o produzido pelo fungo endofítico G20-20. Portanto, este fungo demonstrou ser o mais promissor para a indústria farmacêutica, para atuar no controle da bactéria *E. coli*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ação antibacteriana; Endófitos; Metabólitos secundários.

### **INTRODUÇÃO**

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* habita normalmente o trato-intestinal dos animais (incluindo o homem) e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Entretanto, dentre as cepas de *E. coli*, algumas coletivamente chamadas de ECC (*E. coli* enteropatogênicas) são capazes de provocar doenças em indivíduos humanos (OLSEN et al., 2000).

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. [ravelycasarotti@gmail.com](mailto:ravelycasarotti@gmail.com)

<sup>2</sup>Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [angelak.k@gmail.com](mailto:angelak.k@gmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisador visitante nível 1 do CNPq no Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [jazevedo@esalq.usp.br](mailto:jazevedo@esalq.usp.br)

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [prof.pamphile@gmail.com](mailto:prof.pamphile@gmail.com)

Alguns microrganismos, principalmente fungos e bactérias, habitam o interior das plantas e são encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Esses microrganismos, conhecidos como endófitos ou endofíticos, não causam danos aos seus hospedeiros e os beneficiam à medida que atuam no combate a fitopatógenos, insetos-pragas e herbívoros (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Plantas medicinais vêm sendo pesquisadas devido a pressupostos de interações endofíticas, as quais têm apresentado muitos benefícios, como produção de antibióticos, metabólitos secundários de interesse e controle biológico de pragas e doenças (PILEGGI et al., 2002). Assim, sugere-se que as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal podem estar no endófito e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos (GOMES-FIGUEIREDO, 2006).

Uma alta proporção de fungos endofíticos (cerca de 80%) produz compostos biologicamente ativos em testes de atividade antibacteriana, fungicida e herbicida (SCHULZ et al., 2002). Segundo a hipótese elaborada por Demain (1980), se um fungo pode produzir metabólitos *in vitro*, estes também devem ter uma função *in vivo*. O aparato multienzimático necessário para a síntese dos metabólitos secundários não seria retido pelos fungos sem algum efeito benéfico para sua sobrevivência.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* por metabólitos secundários de quatro fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi).

## 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 *Escherichia coli* ATCC 25922 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 mm<sup>2</sup>) 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 *E. coli* 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 10<sup>6</sup> 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 3,08 e 9,42 mm. Os resultados, bem como a análise estatística, estão detalhados na Tabela 1.

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

Tratamentos/ Controles	Concentração (mg/mL)	Halos de inibição (em mm) (média $\pm$ desvio padrão)*
Metabólito do endófito G20-20	61,4	9,42 $\pm$ 0,63 <sup>c</sup>
Metabólito do endófito G65-65	50,1	3,08 $\pm$ 1,70 <sup>d</sup>
Metabólito do endófito G33-73	19,9	4,17 $\pm$ 0,38 <sup>d</sup>
Metabólito do endófito G53-83	24,0	3,67 $\pm$ 1,66 <sup>d</sup>
Controle positivo 1 (Tetraciclina)	61,4	20,75 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>
Controle positivo 2 (Tetraciclina)	50,1	19,75 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup>
Controle positivo 3 (Tetraciclina)	19,9	18,08 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>
Controle positivo 4 (Tetraciclina)	24,0	19,50 $\pm$ 0,87 <sup>ab</sup>
Controle negativo 1 (Água destilada)	-	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>
Controle negativo 2 (Álcool metílico)	-	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>

\*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 isolados endofíticos do gênero *Pestalotiopsis*. Dentre eles, apenas 2 foram capazes de produzir zonas de inibição quando testados contra *E. coli*, com diâmetros entre 4 e 5 mm.

Ao contrário do obtido no presente estudo, os metabólitos de fungos endofíticos isolados de gimnospermas nativas do Chile foram testados por Hormazabal e Piontelli (2009) e nenhum metabólito testado foi ativo em relação a *E. coli*.

Em metodologia semelhante à utilizada neste trabalho, Souza et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana dos extratos produzidos por 19 fungos isolados das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*. Apenas cinco isolados produziram halos de inibição, cujos halos apresentaram diâmetros com média entre 12 e 19 mm.

## CONCLUSÃO

Entre os metabólitos testados neste trabalho, o mais efetivo foi o produzido pelo fungo endofítico G20-20, que apresentou halo médio de inibição de 9,42 mm, o que mostra que este isolado produz metabólitos secundários com potencial para o controle da bactéria patogênica *E. coli*. Estes resultados indicam o potencial deste fungo endofítico para a indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

DEMAIN, A. L. Do antibiotics function in nature?. **Search**, v. 11, p. 148-151, 1980.

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.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, n. SS01, p. 1-51, 2000.

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.

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.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

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.