

1.06.99 - Química.

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Physalis peruviana* Linnaeus. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.Jade R. Carneiro^{1*}, Hianna A. C. Leite¹, Angélica M. Lucchese²

1. Estudante de Pós-graduação em Biotecnologia/UEFS

2. UEFS - Departamento de Exatas / Orientadora

Resumo:

Fungos endofíticos associados à *Physalis peruviana* L. foram isolados e avaliados quanto sua atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico. Um total de cinquenta fungos filamentosos foram isolados, pela primeira vez na literatura, de folhas, caules, raízes, flores e frutos de *P. peruviana*. *Screening* da atividade antimicrobiana foi feito através do método de difusão em disco contra duas bactérias e uma levedura. Doze isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra um ou mais patógenos. Os três fungos com maior halo de inibição (1F13, 1R14 e 1C13), tiveram sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) determinadas. O isolado *Acremonium*-like sp1 (1F13) obteve o menor valor de CIM (60ug/mL) frente a *C. albicans* CCMB236 (resistente a fluconazol e anfotericina B). O perfil cromatográfico dos extratos dos isolados 1F13, 1R14 e 1C13, sugeriram a presença de compostos fenólicos, esteroides e terpenos.

Palavras-chave: Solanaceae; *Acremonium*; compostos fenólicos.**Apoio financeiro:** CNPq.**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UEFS.**Introdução:**

As plantas medicinais vêm sendo reconhecidas como uma fonte de fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários de importância farmacêutica. A flora brasileira dispõe de diversas plantas de aplicação medicinal, a maioria delas de ação ainda pouco caracterizada cientificamente e inexploradas quanto a microbiota endofítica (SHAN *et al*, 2012).

Physalis peruviana é uma espécie da família Solanaceae conhecida pelos seus frutos comestíveis e uso medicinal tradicional. Os compostos bioativos majoritários da espécie são os vitanolídeos e as fisalinas (A, B, D e F) que apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e anticâncer já descritas (CARRILO-PERDOMOA *et al.*, 2015).

Considerando a importância medicinal desta espécie e tendo em vista os resultados promissores envolvendo a relação mutualística planta-hospedeiro, este trabalho tem como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* (CCMB263 resistente a novobiocina), *Escherichia coli* (CCMB261 resistente a sulfonamida) e *Candida albicans* CCMB286 (resistente a fluconazol e anfotericina B) e a avaliação do perfil cromatográfico de fungos endofíticos com ação antimicrobiana.

Metodologia:**Coleta de material vegetal e isolamento, purificação e identificação da microbiota endofítica fúngica**

Três indivíduos da espécie *P. peruviana* foram coletados em campo de cultivo no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A desinfestação superficial das folhas, flores e frutos foi realizada segundo Wijeratne *et al.*, (2014) com modificações, já do caule e raiz, foi realizada segundo Marquez-Santacruz, *et al.*, (2010). Após secagem da superfície, três pedaços de cada triplicata foram cortados e colocados em placa de petri contendo meio BDA acrescido de Cloranfenicol (100 mg/ml) e incubadas em Estufa de Crescimento à 28°C. Cada colônia emergente foi repicada para novas placas contendo meio BDA até a verificação da pureza. Todos os fungos foram preservados e depositados na Micoteca do LAPRON/UEFS. A identificação morfológica dos isolados selecionados foi realizada no Laboratório de Micologia-LAMIC/UEFS.

Screening da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana, todos os isolados foram submetidos ao método de difusão em disco (Kirby & Bauer, 1960), com modificações contra *Staphylococcus aureus* CCMB263 (resistente a novobiocina), *Escherichia coli* CCMB261 (resistente a sulfonamida) e *Candida albicans* CCMB286 (resistente a fluconazol e anfotericina B) provenientes da Coleção de Cultura de Microorganismos da Bahia-CCMB.

Produção dos extratos

Os fungos 1F13, 1R14 e 1C13, que apresentaram maior halo de inibição na difusão em disco, foram cultivados em caldo Batata Dextrose (1,25 L 5x250 mL) em Shaker, a 150 rpm e 30°C, até zerar o nível de glicose. O micélio foi removido por filtração e os metabólitos presentes no meio líquido foram extraídos com acetato de etila 1:1. Para obtenção dos extratos brutos secos, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Extratos a partir dos meios não fermentados também foram produzidos como controle.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para a determinação do CIM, foi executada microdiluição em caldo, seguindo as normas da CLSI. Foram utilizadas as mesmas cepas patogênicas da difusão em disco. Controles positivos e negativos foram feitos. Para revelação, foi utilizado Resazurina 0,01%. A determinação da CBM/CFM foi feita após a revelação, 1 uL de cada poço em que não houve crescimento bacteriano foi plaqueado em placas de petri contendo Agar MH. A menor concentração em que não houve crescimento é a CBM/CFM.

Perfil químico

Perfil químico foi avaliado através da cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica com os reveladores Anisaldeído/Ácido Sulfúrico (AS) para revelação de terpenos e esteroides, Liebermann-Burchard (LB) para triterpenos e esteróides, Hidróxido de Potássio (KOH) para antronas, antraquinonas e cumarinas, Dragendorff (DRG) para alcaloides e Produtos naturais (NP/PEG) para revelação de compostos fenólicos e flavonoides (WAGNER E BLADT, 2001).

Resultados e Discussão:

Um total de cinquenta fungos endofíticos foi recuperado de folhas, caules, raízes, flores e frutos com as respectivas Taxas de Colonização de 93,3%, 96,4%, 96,4%, 83,3% e 66,6%. Esse é o primeiro relato na literatura de isolamento de fungos endofíticos filamentosos e culturáveis associados à *Physalis peruviana*.

Para triagem da atividade antimicrobiana, todos os isolados foram submetidos ao método de difusão em disco. Doze isolados (24%) apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos um dos microrganismos patogênicos testados. Para *S. aureus* o isolado 1F13 apresentou maior halo de inibição (17 mm), seguido por 1R14 (16 mm) e 1C13 (9 mm), para *E. coli* o isolado 3F31 apresentou maior halo de inibição (11 mm) e para *C. albicans*, novamente o isolado 1F13 apresentou maior halo de inibição (12 mm).

Como pode ser visto na figura 1, os isolados 1F13, 1R14 e 1C13, que apresentaram resultados positivos no teste de difusão em disco, são produtores de pigmentos. Os pigmentos fúngicos possuem um amplo espectro de aplicações na indústria de cosméticos, têxtil, de alimentos e farmacêutica, essa última graças às suas atividades biológicas como ação antibacteriana e antifúngica (Zhou & LIU, 2010).

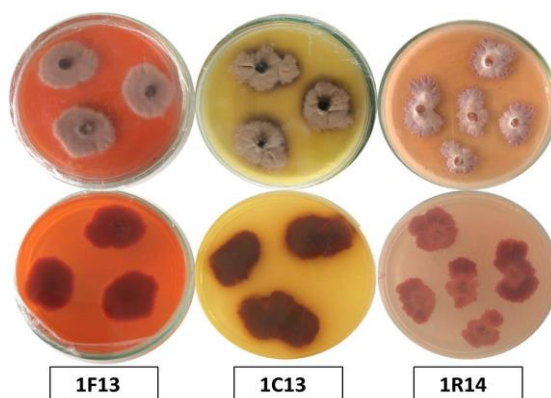


Figura 1. Morfologia externa e produção de pigmentos das culturas dos isolados 1F13, 1C13 e 1R14 após duas semanas de incubação.

Os isolados 1F13, 1R14 e 3F31 foram, respectivamente, identificados pela sua morfologia como *Acremonium*-like sp1, *Acremonium*-like sp2 e *Fusarium* sp1. O fungo 1C13 não foi identificado, pois o micélio se manteve estéril.

Como pode ser visto na tabela 1, a CIM, CBM e CFM dos extratos dos fungos 1F13, 1R14 e 1C13 foi determinada frente as mesmas cepas patogênicas do teste de difusão em disco. O alto valor de CIM encontrado para *E. coli* pode ser devido a membrana externa presente em bactérias Gram-, que aumentam a impermeabilidade da membrana. O isolado *Acremonium*-like sp1 (1F13) apresentou o menor valor de CIM para *C. albicans* [60 ug/uL] e menor valor de CIM para *S. aureus* [120 ug/uL]. Espécies do gênero *Acremonium* são

reportadas como fonte de metabólitos ativos com forte atividade antibacteriana e antifúngica, exemplos desses compostos ativos isolados são o ácido fusídico, cefalosporina C e isoridina A (TIAN, LAI & ZOU, 2017).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos extratos dos isolados 1F13, 1R14 e 1C13.

Micro-organismo	Cloranfenicol	1F13		1R14		1C13	
	Nistatina	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
			CFM		CFM		CFM
S. aureus	<0,01	0,12	0,43	0,99	1,98	0,21	0,43
E. coli	0,33	2,01	4,03	2,01	4,03	1,72	1,72
C. albicans	<0,01	0,06	0,50	0,12	2,01	1,72	6,90

CIM – Concentração inibitória Mínima. CBM/CFM – Concentração Bactericida/Fungicida Mínima. As concentrações de CIM e CBM/CFM dos extratos e cloranfenicol estão expressas em mg.mL⁻¹ e nistatina em L.mL⁻¹.

A avaliação do perfil químico através da CCD indicou a presença de terpenos e esteroides para todos os três extratos avaliados e presença de compostos fenólicos apenas para o isolado 1F13. Cerca de 356 metabólitos já foram isolados de espécies do gênero *Acremonium* e terpenos e esteroides estão entre eles. Flavonoides ainda não foram isolados, mas indicativo da sua presença nesse gênero já foi reportada (SUGIHARTO et al., 2016).

Conclusões:

Os fungos endofíticos *Acremonium*-like sp1 (1F13), *Acremonium*-like sp2 e 1C13 se revelaram fontes promissoras de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. O isolamento dos compostos presentes no extrato bruto do isolado *Acremonium*-like sp1 (1F13), que apresentou menor valor de CIM para dois patógenos já está sendo realizado, entretanto trabalhos futuros serão necessários para identificação desses compostos e elucidação dos mecanismos de ação das moléculas ativas.

Referências bibliográficas

- CARRILO-PERDOMOA E, ALLERA A, CRUZ-QUINTANAB SM, GIAMPIERIC F, ALVAREZ-SUAREZB JM. 2015. Andean berries from Ecuador: A review on Botany, Agronomy, Chemistry and Health Potential. *Journal of Berry Research*. (5): 49-69.
- MARQUEZ-SANTACRUZ HA, HERNANDEZ-LEON R, OROZCO-MOSQUEDA MC, VELAZQUEZ-SEPULVEDA I, SANTOYO G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detecton in the rhizosphere. *Genetics and Molecular research*. (9): 2372-2380.
- SHAN, T. et al. 2012. Antibacterial activity of the endophytic fungi from medicinal herb, *Macleaya cordata*. *African Journal of Biotechnology*. 11(19): 4354-4359.
- SUGIHARTO S, YUDIARTI T, ISROLI I. 2016. Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava. *Antioxidants*.(5): 1-6.
- TIAN L, LAI D, ZHOU L. 2017. Secondary metabolites from *Acremonium* fungi: Diverse structures and bioactivities. *Mini-reviews in Medicinal Chemistr*. (17): 603-632.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 2001. Plant Drug Analysis, a thin layer chromatography atlas. Springer. Second edition.
- WIJERANI, E.M ET AL. 2014. Thielavialides A-E, Nor-spiro-azaphilones and Bis-spiroazaphilone from *Thielavia* sp. PA001, an endophytic fungus isolated from Aeroponically gown *Physalis alkekengi*. *Journal of Natural Products*. (77): 1467-1472.
- ZHOU ZY, LIU JK. 2010. Pigments of fungi (macromycetes). *Natural Products Report*. (27) 1531-1570.