

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Carapa guianensis* E *Duroia macrophylla*

Paula Gabrielly Freire JACYNTHO¹; Cecilia Veronica NUNEZ²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Bolsista PIBIC/CNPq; ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Orientadora LABB/COTI

1. Introdução

Ao longo da história, plantas, animais e micro-organismos são conhecidos como produtores de substâncias naturais e usados tanto como alimentos quanto como medicamentos na medicina popular e clínica. Metabólitos naturais provenientes de tais organismos atuam como valiosos agentes na medicina e agricultura, proporcionando uma série de benefícios à humanidade (Cragg 2007).

Diversas plantas possuem micro-organismos vivendo de forma simbiótica. Estes podem ser fungos ou bactérias endofíticos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente e que não causam danos aparentes aos seus hospedeiros (Hallmann *et al.* 1997; Wilson 1995). Estes endófitos podem penetrar as plantas hospedeiras principalmente pelos estômatos, ferimentos e raízes colonizando-as e são de grande importância biotecnológica já que muitos são produtores de metabólitos secundários, os quais podem se tornar novos produtos farmacêuticos e também podem ser utilizados como agentes de controle biológico, sintetizando substâncias que inibem ataques de mamíferos, insetos e nematóides (Clay 1988; Strobel e Long 1998; Azevedo 2000).

A diversidade destes endófitos é bastante alta em plantas, em particular no Brasil, por possuir uma das maiores floras do mundo e, localizar-se em grande parte na região tropical que é um indicativo de que tenha uma maior diversidade endofítica não somente de fungos como também de bactérias (Azevedo e Araújo 2007).

A composição química de diversas plantas é conhecida, no entanto a sua microbiota associada não. A fim de determinar se é a planta ou o micro-organismo associado ao principal produtor de substâncias ativas, é importante conhecer quais são estes micro-organismos e o que produzem. Podendo assim encontrar novas aplicações nos mais variados setores como o de produtos naturais, biotecnológico, farmacológico e etc.

Com isso, o objetivo geral deste projeto é avaliar se há micro-organismos associados à *Duroia macrophylla* e *Carapa guianensis*, e se estes produzem substâncias com atividade antimicrobiana.



Fig. 01: *Carapa guianensis*



Fig.02: *Duroia macrophylla*

2. Material e Métodos

Coleta

O material vegetal (folhas) utilizado nas pesquisas foi coletado no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA (*Carapa guianensis*) e na Reserva Adolpho Ducke (*Duroia macrophylla*). As amostras vegetais estavam em condições saudáveis, sem manchas ou qualquer tipo de lesão causada por patógenos ou danos mecânicos. Foram coletadas 10 amostras de folhas de cada local. Após a coleta o material foi acondicionado em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em caixas térmicas com gelo e levadas até o laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB), no INPA, onde a pesquisa deu continuidade.

Isolamento dos fungos endofíticos

As amostras coletadas foram lavadas com água corrente e sabão líquido, retirando o máximo possível de impurezas e levadas à câmara de fluxo para serem submersas em soluções apropriadas, onde se iniciou o processo de desinfestação superficial do material pelo método de Pereira *et al.* (1993) e Araújo *et al.* (2001), com modificações. Primeiramente, as folhas foram imersas em álcool a 70 % por 1 minuto, em

seguida imersas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 3 a 4 minutos dependendo da superfície foliar. No caso da andiroba, a folha foi submersa nesta solução por no máximo 3 minutos, pois sua superfície é mais fina e o aumento do tempo proporcionará a degradação da superfície foliar. Já no caso das folhas de *Duroia macrophylla* as folhas foram submersas nesta solução até 4 minutos, pois sua superfície foliar é compacta o bastante para não degradar. Após o hipoclorito de sódio, as amostras são submersas novamente na solução de álcool 70 % por 1 minuto e foi enxaguada por 3 vezes em água destilada estéril por 4 minutos cada uma, sendo a última plaqueada uma alíquota de 100 µL para o controle da desinfestação usada no isolamento. Para cada folha foram retirados 5 pequenos fragmentos com 0,5 cm de tamanho, onde foram isoladas em placa de Petri contendo meios de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) e Ágar Sabouraud juntamente com o antibiótico oxitetraciclina a 2,5 µg/mL para a eliminação de bactérias e isolar somente fungos.

Estudos Fitoquímicos

As folhas de plantas *D. macrophylla*, *C. guianensis*, depois de secas em estufa de circulação, foram moídas para serem preparados extratos vegetais. Estes foram preparados com solventes de polaridade crescente (hexano e metanol) em ultrassom por 20 minutos 3 vezes e rota evaporado a uma rotação de 80 rpm e uma temperatura de 40°C. Após concentrados os extratos foram secos em capela a temperatura ambiente. Os fungos foram colocados em suspensão para crescimento de massa micelial para que as extrações pudessem ser feitas. Posteriormente, os extratos fúngicos foram preparados com a mesma metodologia, porém, utilizando acetato de etila (por gerar mais massa que outros solventes (Alberto 2009)). Uma vez preparados, todos os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando diversos reveladores (físicos e químicos) para detectar a presença de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados, e comparados com os presentes nas plantas. Os extratos vegetais e fúngicos foram testados para analisar sua potencialidade quanto à suas atividades antimicrobianas.

3. Resultados e Discussão

As plantas foram coletadas e desinfestadas. Das folhas foram obtidos 18 fungos que se mostraram diferentes macroscopicamente: 6 fungos de *C. guianensis* e 12 fungos de *D. macrophylla*. A desinfestação feita nas folhas foi eficiente, ou seja, não houve crescimento de micro-organismos epifíticos, somente os endofíticos. Em todos os fragmentos foliares cresceram fungos.



Fig.03: Fungos obtidos de *C. guianensis*.



Fig.04: Fungos obtidos de *D. macrophylla*.

Quanto aos ensaios de atividade antimicrobiana, os utilizados para extratos vegetais e fúngicos de *Duroia macrophylla* e *Carapa guianensis* foi utilizado a técnica de microdiluição, onde é plaqueado várias concentrações de extratos, estes diluídos com DMSO (dimetil sulfóxido), que variam de 1000 µg/mL até 15,6 µg/mL em placa de 96 poços e, junto, bactérias variadas (ensaio MIC, concentração inibitória mínima). Após 24 horas é adicionado um revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo), que permite identificar através de colorações quais concentrações são bactericidas (mata totalmente a bactéria, expressas em cor amarela) e bacteriostáticas (inibe o crescimento da bactéria, expressas em cor vermelha), sendo esta última etapa confirmada através do ensaio de MBC, concentração mínima bactericida, onde indica a menor concentração que mata ou inibe a ação de determinado micro-organismo. Como controle é utilizado oxitetraciclina a 125 µg/mL e como controle negativo DMSO.

A tabela expressa todas as concentrações testadas em ensaio de MBC. As concentrações que foram bactericidas estão destacadas, em negrito. As demais são todas bacteriostáticas.

Para os extratos fúngicos o resultado se expressou de forma simples: nenhum extrato fúngico foi ativo para as bactérias testadas (as mesmas utilizadas nos ensaios com extratos vegetais), ou seja, nenhuma concentração foi ativa frente às cepas testadas.

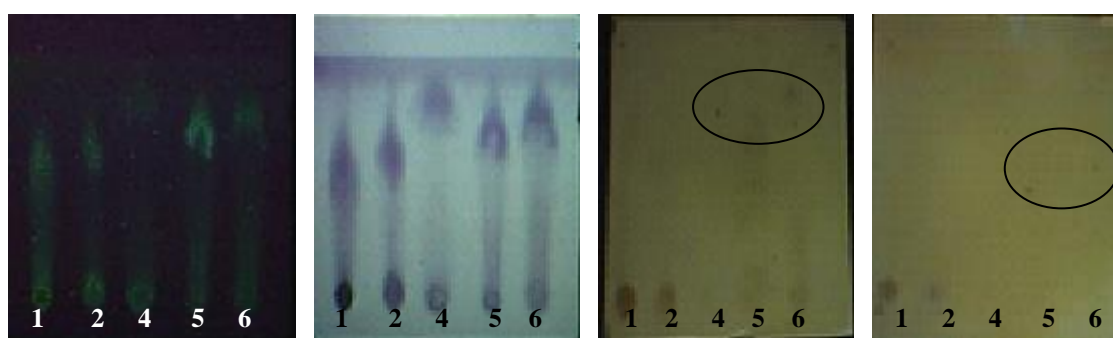
Tabela 1: Resultados obtidos para a concentração mínima bactericida para os extratos vegetais.

Planta	Extratos	<i>Aeromonas hydrophilla</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Carapa guianensis</i>	Fo MeOH	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	Fo HEX	1000	> 1000	> 1000	1000
<i>Duroia macrophylla</i>	Fo MeOH	500	> 1000	> 1000	1000
	Fo HEX	1000	500	> 1000	1000

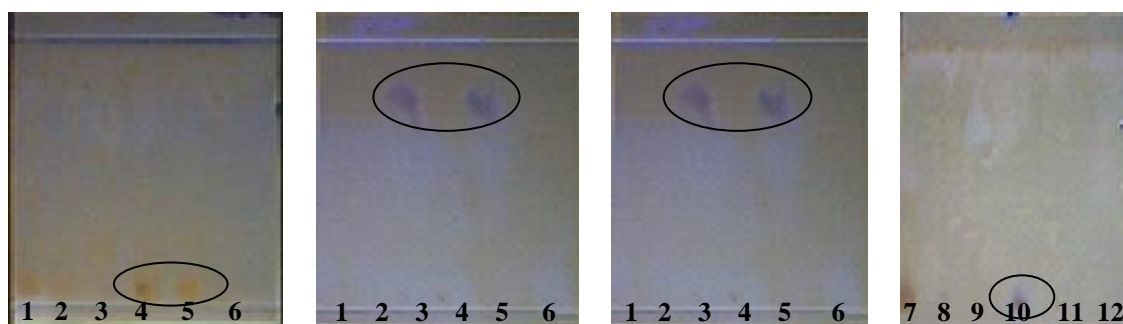
3.1 Resultados fitoquímicos

Quanto aos resultados da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), o sistema de eluição utilizado para analisar os extratos fúngicos de *C. guianensis* foi acetona-metanol na proporção de 7:3, pois somente neste sistema houve uma eluição suficiente para migrar os compostos da origem. Nos extratos de *D. macrophylla* foi utilizado o sistema acetona-metanol também, mas na proporção de 8:2, por também ser somente este sistema capaz de realizar a migração dos compostos pela placa.

As amostras revelaram ter compostos bem interessantes. Nas amostras 5 e 6 de *C. guianensis* há a presença fraca de alcaloides (mostrado pelos reveladores Dragendorff) e flavonoides (mostrado pelas luzes UV 365 nm, cloreto de alumínio), mesmo que em pequenas quantidades, como os indicados nas placas abaixo. Nas demais amostras há a presença de compostos com grande fluorescência, mostrados nas placas reveladas com luz UV 254 e 365 nm. Já os extratos fúngicos de *D. Macrophylla*, as amostras 3,5 e 10 revelaram ter terpenos e as amostras 4 e 5 revelam ter alcaloide também em pequenas quantidades, como pode ser visualizados nas placas abaixo. As outras placas com outros reveladores não demonstraram ter compostos diferentes quando visualizadas com os outros reveladores, como iodo, anisaldeído e sulfato cérico.



Luz UV 365 Luz UV 254 Cloreto de alumínio Dragendorff
 Figura 5: Placas cromatográficas dos extratos fúngicos de *C. guianensis*.



Dragendorff Sulfato cérico Cloreto de alumínio Dragendorff
 Figura 6: Placas cromatográficas dos extratos fúngicos de 1 a 6, isolados de *D. macrophylla*.

4. Conclusão

O trabalho desenvolvido teve como objetivo comparar se os extratos fúngicos das plantas *C. guianensis* e *D. macrophylla* produzem compostos (metabólitos secundários) de interesse e se estes são os mesmos produzidos pelas plantas das quais foram extraídos.

Como os resultados demonstraram os fungos isolados de *C. guianensis* produzem alcaloides e flavonoides, metabólitos diferentes dos produzidos pela planta normalmente enquanto os fungos obtidos de *D. macrophylla* produzem terpenos e alcaloides, estes sim produzidos pela planta normal também. Portanto, os fungos isolados devem ser estudados mais a fundo a fim de identificar se podem ou não ser uma fonte alternativa para produzir as substâncias (metabólitos secundários) de interesse em vários setores de pesquisa, principalmente o de produtos naturais.

Comprovou-se que a desinfestação superficial utilizada nos isolamentos é de eficácia para isolar somente fungos endofíticos e eliminar os fungos epifíticos. Quanto aos ensaios de atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos, estes não apresentaram nenhuma atividade inibitória contra as cepas testadas enquanto que os extratos vegetais apresentaram atividade bactericida somente na concentração de 500 µg/mL.

Com a identificação de classes químicas presentes nos extratos fúngicos, os próximos passos são a continuação dos estudos fitoquímicos para determinar os metabólitos produzidos por estes fungos e se são similares ou não aos da planta. Com isto espera-se descobrir onde estes metabólitos são produzidos.

5. Referências Bibliográficas

- Alberto, R.N.; Orlandelli, R.C.; Garcia, A.; Pamphile, J.A. 2009. Avaliação de metabólitos de isolado endofítico de *Sapindus saponaria* no controle de patógenos. VI EPCC: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. p. 2-4.
- Araújo, W.I. *et al.* 2001. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 229-236.
- Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. USA, p. 189-207.
- Azevedo, J.L.; Júnior, W.M.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Eletronic Journal of Biotechnology*, 1: 40-65.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69: 10-16.
- Cragg, G.M.; Newman, D.J. 2007. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos. In: Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Ed. Itajaí, Universidade do Vale de Itajaí, p. 66-68.
- Hallmann, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43: 895-914.
- Gardner, W.A.; McCoy, C.W. 1992. Inseticides and herbicides. In: Finkelstein, D.B.; Ball, C. Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. Boston: Ed. Butterworth-Heinemann, p. 335-359.
- Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia*, 85: 362-364.
- Spiteller, M.; Puri, S.C.; Verma, V.; Amna, T.; Qazi, G.N. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.*, 68: 1717- 1719.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 260: 214-216.
- Strobel, G.A.; Long, D.M. 1998. Endophytic microbes embody harmaceutical potencial. *ASM News*, 64: 263-268.
- Wilson, D. 1995. Endophyte – the evolution of a term, and classification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.