BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Physalis peruviana* Linnaeus. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Jade Ribeiro Carneiro¹; Angélica Maria Lucchese²; Hianna Almeida Câmara Leite³ e Luís Fernando Pascholati Gusmão⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rc.jade@hotmail.com
2. Orientador, Departamento Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anlucc@uefs.br
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: leite.hianna@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: *Physalis peruviana*; *Acremonium*; compostos fenólicos.

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.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Três indivíduos da espécie *P. peruviana* L. foram coletados em campo de cultivo no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A desinfecção das folhas, flores e frutos foi realizada segundo Wijeratne *et al.*, (2014) com modificações. Para cada indivíduo, as três partes foram submetidas a desinfestação superficial através da sequência de 95% EtOH por 30 s, 0,5% NaOCl por 2 min e 70% EtOH por 2 min. Para caule e raiz, foi realizada segundo Marquez-Santacruz, *et al.*, (2010). Os caules e raízes foram previamente cortados e submetidos a desinfestação superficial através da sequência de 70% EtOH por 3 min, 2,5% NaOCl por 3 min, e 70% EtOH por 30 s. Após secagem da superfície, as partes foram novamente cortadas e três pedaços de cada triplicata 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 (HiMedia®) (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) e 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 do meio 1x concentrado, 2x concentrado, dos micro-organismos, do DMSO, do antibiótico Cloranfenicol [6 ug/uL] e Nistatina [2 ug/uL] 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 antranas, 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.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- CARRILO-PERDOMO E, ALLERA A, CRUZ-QUINTANA B SM, GIAMPIERIC F, ALVAREZ-SUAREZ B 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 detection 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 Chemistry*. (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 grown *Physalis alkekengi*. *Journal of Natural Products*. (77): 1467-1472.
- ZHOU ZY, LIU JK. 2010. Pigments of fungi (macromycetes). *Natural Products Report*. (27) 1531-1570.