

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

### METABÓLITOS DO FUNGO ENDOFÍTICO 2FR11

**William Wallace dos Santos Silva<sup>1</sup>; Alexandre de Freitas Espeleta<sup>2</sup>; Jade Ribeiro Carneiro<sup>3</sup> e Angélica Maria Lucchese<sup>4</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [ww.silvaa@gmail.com](mailto:ww.silvaa@gmail.com)

2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [espeleta@uefs.br](mailto:espeleta@uefs.br)  
3. Participante do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (Lapron), Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [rc.jade@hotmail.com](mailto:rc.jade@hotmail.com)  
4. Participante do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (Lapron), Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [angelica.lucchese@gmail.com](mailto:angelica.lucchese@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pseudopithomyces* sp, cultivo, antimicrobianos

### INTRODUÇÃO

Não é de hoje que fungos chamam atenção pela sua atividade biológica, um dos primeiros antibióticos encontrados é produzido por esses seres. “A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, é um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX” (PEREIRA; PITA, 2018). A capacidade de metabólitos secundários dos fungos de inibir ou matar patógenos, e tratar outras doenças, até hoje desperta o interesse da comunidade científica pra a descoberta de novos metabólitos ativos (SOUZA et al, 2004).

Os fungos endofíticos são microrganismos que estão presentes no interior das plantas durante todo ou, pelo menos, uma parte do seu ciclo de vida, sem causar prejuízos ou danos aparentes (DUTTA et al., 2014). Dentro de uma relação simbiótica com sua planta hospedeira, os fungos podem desempenhar funções relevantes e produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos que beneficiam a planta (PEIXOTO NETO et al., 2002). O endofitismo oferece várias vantagens para as plantas hospedeiras. São: (i) maior acesso aos nutrientes, (ii) proteção contra dessecação e (iii) proteção contra insetos que alimentam-se da planta, fungos parasitas, etc. (DUTTA et al., 2014).

Estas substâncias de proteção em endofíticos podem apresentar ações biológicas de interesse, Liu (2007) encontrou fenóis e flavonoides antioxidantes oriundos do endofítico *Xylaria* sp. de *Ginkgo biloba* e Oliveira (2018) isolou 18 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber que apresentaram atividade antimicrobiana. Desta forma,

o objetivo deste trabalho foi investigar a composição química do fungo endofítico 2FR11 selecionado pelo seu potencial antimicrobiano.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção dos extratos brutos em meio batata dextrose (BD)**

O fungo isolado 2FR11 foi repicado em placas contendo meio Batata dextrose ágar (BDA) e incubados por 7 dias a 28°C. Para a cultura fermentativa, discos de 6 mm do micélio (8 discos para cada 250 mL) foram transferidos das placas de Petri para os frascos reagentes (shots) contendo 250 mL de caldo BD. As culturas foram mantidas sob agitação em uma Incubadora de agitação orbital (shaker) a 150 rpm na temperatura de 28°C. A quantidade de glicose do meio foi monitorada com tiras de reagentes, em alíquotas retiradas da cultura a partir de 7 dias do início do cultivo, em intervalos de 48h. Os cultivos foram interrompidos quando a glicose foi totalmente consumida, correspondendo aproximadamente a 14 dias de cultivo e foi medido o pH do meio com o auxílio de fitas indicadoras (Macherey-Nagel). Após a remoção do micélio por filtração a vácuo, o filtrado foi extraído com acetato de etila por meio da extração múltipla na proporção 1:1 (extrato e solvente), em seguida foi secado com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido por rotaevaporação sob pressão reduzida para obtenção dos extratos brutos.

### **Obtenção dos extratos brutos em meio arroz**

O fungo isolado 2FR11 foi repicado em placas contendo meio BDA e incubados por 7 dias a 28°C. Para a cultura fermentativa, discos de 6 mm do micélio (2 discos para cada 100g) foram transferidos dos frascos de 20 ml contendo 10 ml de caldo BD. As culturas foram mantidas sob agitação em uma Incubadora de agitação orbital (shaker) a 150 rpm na temperatura de 28°C por 2 dias. Os cultivos foram transferidos para frascos reagentes (shots) contendo 100 g de arroz branco e 150 ml de água destilada. Após 30 dias o meio foi extraído com acetato de etila (aproximadamente 100 ml) por meio da extração múltipla. O solvente e o meio foram mantidos ao abrigo da luz por 2 dias, em seguida filtrados e secado com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido por rotaevaporação, sob pressão reduzida, para obtenção dos extratos brutos.

### **Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada**

Os extratos oriundos do cultivo em caldo batata dextrose e em arroz foram submetidos à análise em CCD para determinação do perfil cromatográfico, em placas de sílica. As placas foram previamente ativadas em estufa a 100°C por 1 hora, após ativação, as

amostras, na concentração de 10 mg/mL, foram aplicadas nas cromatoplasmas com auxílio de capilares, utilizando como solvente uma mistura de acetona/diclorometano 9:1. Após a corrida, as placas foram analisadas em luz UV (a 254 e 365 nm) e no visível, e foram utilizados os reveladores NP/PEG, Anisaldeído/Ácido sulfúrico e Dragendorff (WAGNER; BLADT, 2001).

### **Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os extratos oriundos do cultivo em caldo batata dextrose foram analisados por CLAE. O equipamento utilizado para as análises foi um cromatógrafo Shimadzu® (CBM-20A), equipado com duas bombas Shimadzu® (LC-10ATVP), forno Shimadzu® (CTO-10ASVP), injetor manual e sistema de integração computadorizado com software LC Solution. A coluna analítica C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) da marca Acentis® foi utilizada com fluxo, temperatura de forno e volume de injeção fixados em: 1,0 mL/min; 30°C e 20 µL. A fase móvel foi constituída de (A) água ultrapura (18,2 MΩ/cm) e (B) acetonitrila grau espectroscópico. Um gradiente de eluição foi utilizado com as seguintes condições de separação: 30% de B até 60% em 30 min, 100% durante 10 minutos e retorno do gradiente foi feito em 4 minutos (100-30% de B). O detector por arranjo de diodo (DAD) foi utilizado. As amostras dos extratos brutos foram injetadas na concentração de 10 mg/mL

### **Isolamento**

Os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna (CC) para sua purificação utilizando como fase estacionária silicagel (0,060-0,200mm) e como fase móvel hexano, acetona e metanol.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O fungo 2FR11 foi isolado do fruto de *P. peruviana* e identificado recentemente (CARNEIRO, 2020) através da sua região ITS, como *Pseudopithomyces* sp. Seu extrato, oriundo do cultivo em caldo batata dextrose, apresentou atividade antimicrobiana frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* CCMB263 (resistente a novobiocina), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a metilicina) e *Candida albicans* CCMB286 (resistente a fluconazol e anfotericina B) com valores de Concentração inibitória mínima (CIM) entre 2 e 0,5 mg/mL (CARNEIRO, 2020), justificando assim o interesse no isolamento dos metabólitos ativos.

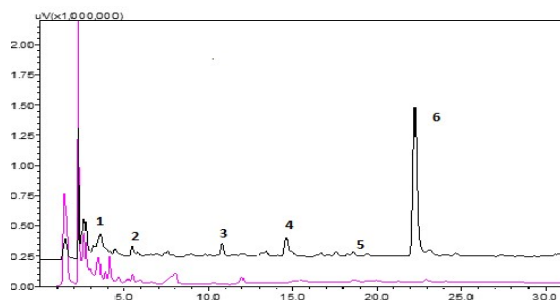
Para isso *Pseudopithomyces* sp foi cultivado em dois meios, caldo de batata dextrose (BD) e em arroz, e os extratos foram obtidos com rendimentos de 0,1057 g/L em BD e

3,779 g/L em arroz. Oliveira et al. (2017) também encontrou um rendimento maior em compostos orgânicos no cultivo de arroz quando comparado ao meio BD, essa diferença pode estar relacionada a interferência na biossíntese em função de parâmetros de fermentação como tempo, temperatura, pH e nutrientes (PFEFFERL, THEOBALD, GURTLER, 2000).

Para comparação da produção de metabólitos destes dois extratos foi utilizada a cromatografia em camada delgada visando a avaliação do perfil cromatográfico. Pela análise dos perfis cromatográficos em CCD, utilizando os reveladores cromogênicos NP/PEG, anisaldeído/ácido sulfúrico e Dragendorff, foi possível perceber a presença de metabólitos das classes dos compostos fenólicos, terpenos e esteróides, bem como alcalóides. Além disso, verificou-se que as duas diferentes formas de cultivo, meio de caldo batata dextrose e arroz, não interferiram no tipo de metabólito, pois os perfis cromatográficos apresentaram-se praticamente idênticos.

A análise por CLAE foi realizada apenas com o extrato oriundo do cultivo em meio líquido e o perfil cromatográfico está apresentado na figura 1.

**Figura 1** - Cromatogramas ( $\lambda = 254$  nm) do extrato em acetato de etila do fungo *Pseudopithomyces* sp. (em preto) em CLAE/DAD e do controle do meio não fermentado (em rosa)



Comparando-se o cromatograma do caldo não fermentado com o oriundo do extrato fúngico é possível perceber sobreposição de alguns dos sinais, em especial no tempo de retenção inferior a 5 min. É possível que estas substâncias em comum sejam oriundas do meio BD e não tenham sido metabolizadas durante o cultivo do fungo, sendo extraídas conjuntamente. Destacam-se alguns sinais cromatográficos (1 a 6) os quais apresentaram espectros no ultravioleta distintos ou não estão presentes no caldo não fermentado.

Há poucos relatos de estudos para este gênero, em sua maioria como fitopatógeno ou sapróbico (ARIYAWANSA, 2015). Perelló et al. (2016) isolaram *P. chartarum* como

fitopatogênio de trigo e 4 micotoxinas foram detectadas: alternariol, éter monometílico do alternariol, altertoxina I e II. O alternariol é uma benzocromenona que causar doenças de manchas foliares em várias plantas medicinais, gramíneas, cereais e leguminosas, além de causar danos à pele de ovelhas, cabras e gado (PERELLÓ *et al*, 2016).

Para isolamento dos metabólitos de *Pseudopithomyces* sp, os extratos foram submetidos a cromatografia em coluna para purificação, tendo sido obtido 165 frações que estão em análise por cromatografia em camada delgada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de *Pseudopithomyces* sp, obtidos após cultivo em caldo de batata dextrose e arroz, apresentaram uma diversidade de metabólitos em comum, tais como esteroides, terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que estão em processo de isolamento e purificação.

## REFERÊNCIAS

- CARNEIRO, J.R. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Physalis peruviana* L. (SOLANACEAE)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Ciências Biológicas, UEFS, Feira de Santana, 2020.
- CROUS, P.W. et al. **Fungal Planet description sheets: 469-557**. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, Persoonia, v. 1, n. 37, p. 218-403, 2016.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2a. ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2002. v. 5.
- DUTTA, D. et al. **Endophytes: exploitation as a tool in plant protection**. Braz. Arch. Biol. Technol, v. 57 n.5, p 621-629, 2014.
- HAWKSWORTH, D; LUCKING, R. **Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species**. Microbiology Spectrum. 2017.
- JIAO, R. H. et al. **Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic Chaetomium sp. IFB-E015**. Organic Letters, v. 8, n. 25, p. 5709–5712, 2006.
- LIU, X. et al. **Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from Ginkgo biloba**. Food Chemistry, v. 105, p. 548–554, 2007
- OLIVEIRA, T.C. **Avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora de extrato de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) visando aplicações cosméticas**, MG:Juiz de Fora, 2016
- OLIVEIRA, J. G. de S. **Bioprospeção de alcaloides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. 162 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018
- PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. **Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945)**. História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto, v. 6, 2018.
- PERELLÓ, A. et al. ***Pseudopithomyces chartarum* associated with wheat seeds in Argentina, pathogenicity and evaluation of toxigenic ability**. European Journal Of Plant Pathology, [S.L.], v. 148, n. 2, p. 491-496, 2016.
- SOUZA, A. Q. L. de et al. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Bentham**. *Acta Amazonica*, vol.34, n.2 , pp.185-195,2004.
- STROBEL, G. A. **Endophytes as sources of bioactive products**. Microbes and Infection, v. 5, p. 535–544, 2003