



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

COMPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ATIVOS A PARTIR DO FUNGO ENDOFÍTICO *Drechslera sp* **Humberto Fernandes Nascimento Junior¹; Angélica Maria Lucchese²; Jade Ribeiro Carneiro³ e Hianna Câmara Leite⁴.**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: humbertojc@mail.com.
2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
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
4. Participante do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (Lapron), Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hianna.leite@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: endófitos; atividade antimicrobiana; metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) a resistência bacteriana é uma das principais ameaças à saúde humana, pois, as bactérias são resistentes à maioria, ou até a todos, os antibióticos disponíveis no momento, dificultando ou impedindo o tratamento de infecções (WHO, 2014). Devido ao elevado número de moléculas antibióticas que já foram encontradas em fontes naturais (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), os produtos naturais são um dos principais alvos de estudos de prospecção de novos antimicrobianos. Entre eles estão os endofíticos, que podem ser bactérias, fungos ou até vírus, encontrados em espaços intra-celulares de plantas medicinais, como: caule, folha, flor e/ou raízes, ocorrendo uma relação de endossimbiose com o hospedeiro (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007; HYDE & SOYTONG, 2008). Cabe ressaltar que cerca de 80% destes fungos estudados produzem moléculas com propriedades de interesse farmacêutico (SPECIAN et al., 2014). Devido a existência de bactérias resistentes a antimicrobianos de alta potência, a busca por novos antimicrobianos é de suma importância para a sobrevivência humana, em especial frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Treponema pallidum* (SILVA; AQUINO, 2018). Neste sentido a busca por novos antimicrobianos deve ser contínua, uma vez que os micro-organismos ganham resistência de maneira mais acelerada do que surgem novos antimicrobianos. Desta forma o objetivo deste trabalho

foi avaliar diferentes meios de cultivos para seleção do mais adequado visando o isolamento de metabólitos antimicrobianos de *Drechslera* sp.

METODOLOGIA

Obtenção dos Extratos Brutos

Foram obtidos extratos brutos a partir da fermentação do endófito em meios de cultura líquidos e sólidos, com extração de metabolitos produzidos pelo mesmo (extratos fermentados). Em paralelo, extratos brutos foram produzidos com extração de constituintes presentes nos meios cultivos líquidos e sólidos, sem a fermentação do endófito (extratos controles), submetendo somente os meios de cultivos, nas mesmas condições quando aplicados para produção dos extratos fermentados. Os meios de cultivo utilizados foram extrato malte ágar (EMA), extrato malte cervejeiro ágar (EMAS), caldo extrato malte (EM), caldo batata dextrose (BD), batata dextrose ágar (BDA) e cultivo em arroz (ARROZ).

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012a; CLSI, 2008). A cepa de *S. aureus* MRSA37 multirresistente (isolado clínico), foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e as demais cepas de microrganismos *S. aureus* CCMB263, *S. aureus* ATCC43300, *Escherichia coli* CCMB261 e *Candida albicans* CCMB286 foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB).

Perfil Químico

Os extratos brutos obtidos (fermentados e controles) foram submetidos a análise do perfil químico, através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Os extratos na concentração de 5 mg/mL, foram inseridos através de tubo capilar na placa de sílica, e eluído em cuba cromatográfica contendo o sistema de solvente hexano:acetona (8:2), com observação na luz visível, a 365 nm e 254 nm, bem como pulverização com reveladores químicos anisaldeído-sulfúrico (AS) e Difetilboriloxietilamina e Polietilenoglicol (NP-PEG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise dos rendimentos obtidos de cada extrato bruto observa-se a presença de três grupos diferenciados: os extratos do cultivo em meio líquido (EM e BD), com menores rendimentos (0,050 g/L e 0,046 g/L); o grupo oriundo do cultivo em meio sólido de ágar

(BDA, EMA, EMAS) com teores intermediários (0,24 g/L, 0,36 g/L e 0,44 g/L), e por fim o extrato obtido em arroz, com os maiores rendimentos (2,15 g/L). As extrações por cultivo em meio sólido podem ter seu rendimento aumentado, pois são obtidos, além dos metabolitos produzidos pelo fungo, elementos que compõem o ágar e a estrutura celular, que resultam no incremento da sua massa, o que não é observado no meio líquido.

A atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido pela fermentação do endófito *Dreschlera sp.* no meio EM, evidenciou capacidade antimicrobiana frente as bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e a levedura (*C. albicans*), sendo a bactéria gram-negativa (*E. coli*) a única resistente ao extrato do endófito testado (Tabela 1). A resistência apresentada pela *E. coli* pode ser atribuída a distinção morfológica apresentada pelas bactérias gram-negativas, pois, apresentam estrutura celular mais complexa do que a gram-positiva, devido a presença da membrana externa que dificulta a ação antimicrobiana (PINTO, 2008).

Tabela 1: Comparação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) e de CBM ($\mu\text{g/mL}$) apresentados pelo extrato brutos de malte obtido com fermentação (EM) e do extrato de malte obtido sem fermentação do endófito(C.EM).

Extrato Bruto	Microrganismos Testados									
	<i>S aureus</i> CCMB263		<i>S aureus</i> ATCC43300		<i>S aureus</i> MRSA37		<i>E coli</i> CCMB261		<i>C albicans</i> CCMB286	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EM	625	SA	750	SA	417	2670	SA	SA	3000	3000
C.EM	1500	SA	3000	SA	1500	SA	SA	SA	3000	SA
Cloraf.	<10	*	9,35	*	9,35	*	300	*	*	*
Nistat.	*	*	*	*	*	*	*	*	<10	*
DMSO	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

Valores da média na mesma coluna; SA: sem atividade na maior concentração testada; *: não foi testado;

Fonte: O autor (2020).

Os valores de CIM e CBM (3000 $\mu\text{g/mL}$) apresentados pelo extrato frente a *C. albicans* foi de superior aos valores apresentados para as cepas de *S. aureus*, neste sentido as cepas mais sensíveis foram selecionadas para estudo comparativo entres os diferentes extratos brutos obtidos.

Os extratos com melhor resultado de atividade antimicrobiana frente *S. aureus* (CIM entre 417 e 1500 $\mu\text{g/mL}$) foram os provenientes dos meios contendo malte, reforçando a afinidade pelo endófito a este meio de cultivo. Os meios BD e BDA foram os menos ativos, com CIM entre 750 e 3000 $\mu\text{g/mL}$. Entre as extrações líquidas e sólidas é observado perda da atividade biológica nas extrações sólidas, este efeito deve-se a elementos que compõem o ágar e a estrutura celular, presente nos extratos sólidos incluindo o de arroz, extraídos conjuntamente com os metabólitos do fungo. Isto pode

explicar a perda da atividade biológica no extrato de arroz para as cepas de *S aureus* ATCC43300 e MRSA37. Por outro lado, o extrato oriundo do cultivo em arroz foi o de maior atividade biológica para a cepa de *S aureus* CCMB263, com valor de CIM em 500 µg/mL, sendo o único extrato com atividade bactericida para este patógeno. Assim considerando o elevado teor de extrativos e a ação bactericida, o cultivo em arroz foi o selecionado para a produção em escala ampliada dos extratos para o isolamento de metabólitos.

Na tentativa de identificar classes de compostos através da CCD, as placas eluidas com os extratos, foram submetidas a pulverização com os reagentes químicos AS e NP-PEG para identificar terpenos/esteróides e compostos fenólicos, respectivamente. Entre os reveladores químicos utilizados os extratos foram positivos para terpenos e esteroides através do revelador AS, e negativo para compostos fenólicos através do revelador NP-PEG.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos obtidos por meio da fermentação do endófito *Dreschlera* sp. possuem alta capacidade antimicrobiana, e o estudo dos seus metabólitos devem prosseguir para futuro isolamento de moléculas ativas.

REFERÊNCIAS

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A9, 9 ed., n. 2. Pensilvânia: CLSI, 2012a. 68p.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Quim. Nova**, V. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- PINTO, C.P.; PINTO, R. P.; UETANABARO, A. P. T.; PINHEIRO, C. S.R.; GADEA, S. F. M.; SILVA, T. R. S.; LUCCHESI, A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, 2013.
- SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, [s. l.], v. 16, n. 345, p. 345–351, 2014.