

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO FUNGO ENDOFÍTICO CL7 DE *Chromolaena laevigata* (LAM.) R.M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Rodolfo Bento Balbinot<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Josiane Aline Monteiro de Oliveira<sup>1</sup>, Andressa Domingos Polli<sup>2</sup>, Eliana Harue Endo<sup>3</sup>, Benedito Dias Prado Filho<sup>3</sup>, João Alencar Pamphile<sup>2</sup> (Coorientador), Debora Cristina Baldoqui<sup>1</sup> (Orientadora), e-mail: dcbaldoqui@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / <sup>1</sup>Centro de Ciências Exatas, <sup>2</sup>Centro de Ciências Biológicas, <sup>3</sup>Centro de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

### Ciências Exatas e da Terra – Química

**Palavras-chave:** *Chromolaena laevigata*, endofíticos, antimicrobiano.

### Resumo:

O gênero *Chromolaena* pertence à família Asteraceae, compreendendo 71 espécies, sendo que 45 destas são endêmicas do Brasil, e estão distribuídas por todo o território nacional. Foram obtidas 42 linhagens de fungos endofíticos de *Chromolaena laevigata*, sendo possível alocá-los em 24 morfogrupos distintos, com base na cor da colônia e formato do micélio. Dos quais foi escolhido de maneira aleatória o fungo CL7 para produção de metabólitos secundários e avaliação do perfil químico e biológico. Foi identificada a presença do composto 4-hidroximetil-5-hidroxi-2H-piran-2-ona no extrato. Com relação a atividade antimicrobiana, o extrato de metabólitos secundários não se mostrou ativo.

### Introdução

Microrganismos endofíticos são fungos ou bactérias que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar doenças (AZEVEDO, 2000). Atualmente, devido à especificidade e as características únicas destes microrganismos em se adaptar e estabelecer intrínsecas relações simbióticas com a planta hospedeira, aliada com o desenvolvimento do setor biotecnológico, os microrganismos endofíticos despertaram o interesse da comunidade científica como fontes alternativas de enzimas, compostos bioativos, além da aplicação no controle de pragas e patógenos. Várias classes de metabólitos secundários como alcaloides pirrolizidínicos, esteroides, terpenoides, sesquiterpenos, quinonas, flavonoides, fenilpropanoides, policetídeos, lactonas, entre outros, são produzidos por fungos endofíticos, o que os caracterizam como uma fonte promissora para estudos de exploração do potencial biotecnológico de produtos aplicados em diversas áreas.

A espécie *Chromolaena laevigata*, é um arbusto, nativo do Brasil, sendo usualmente encontrada no Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga. O primeiro estudo químico da espécie *C. laevigata* por Misra e colaboradores revelou a presença de quatro derivados de cadinenos largamente encontrados neste gênero, alguns sesquiterpenos, além de derivados clerodanos. A espécie *Chromolaena laevigata* foi então selecionada para estudos dos seus fungos endofíticos devido à sua ocorrência em abundância na região de Ponta Grossa e à ausência de estudos de fungos endofíticos descritos na literatura.

## Materiais e métodos

### *Isolamento dos fungos endofíticos*

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 2016 no Parque do Guartelá e identificado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O isolamento dos fungos endofíticos da planta *C. laevigata* foi realizado utilizando a metodologia descrita por Pamphile & Azevedo (2002) modificada. As folhas foram selecionadas de forma que não apresentassem marcas visíveis de ataque por patógenos ou manchas. Após a desinfecção superficial, as folhas foram cortadas em fragmentos com tamanho entre 0,3 e 0,5 cm<sup>2</sup>. Em seguida, cinco fragmentos foliares foram inseridos em cada placa de Petri contendo meio BDA, acrescidos de 50 µg. mL<sup>-1</sup> de tetraciclina, para inibir o crescimento bacteriano. Cinquenta placas foram incubadas em estufa de crescimento a 28°C, durante sete dias. Os fungos crescidos foram transferidos para novas placas contendo BDA para o processo de purificação.

### *Estudo químico*

Para obtenção de metabólitos secundários, o fungo CL7 foi escolhido aleatoriamente. Este foi incubado em 3 erlenmeyers, contendo caldo BD – Batata-Dextrose (250 mL cada), posteriormente dispostos na estufa de crescimento à 28°C, durante 21 dias. O meio fermentado foi filtrado em funil com gaze e em seguida centrifugado a 2750 × g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para funil de separação e submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila grau P.A. (3 x 100 mL). A fase orgânica resultante da extração foi tratada com secante (sulfato de sódio anidro), e esta fração foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo R-3000 Buchi, a 37°C, obtendo-se o extrato bruto de metabólitos secundários. O extrato dos metabólitos secundários produzido (CL7-EB) foi submetido a análise de RMN de <sup>1</sup>H para observação do perfil químico do extrato. O fungo CL7 produziu uma secreção, semelhante a um óleo, durante o período de incubação no meio líquido contendo BD, e este foi separado com auxílio de uma pipeta e em seguida submetido a filtração para retirada de possíveis esporos. O líquido se mostrou solúvel apenas em

MeOH e foi renomeado como CL7-OL e submetido a análise de RMN de  $^1\text{H}$ . As amostras CL7-OL e CL7-EB foram para as demais análises de RMN de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC por apresentarem um perfil de composto puro, sendo este codificado como **FCL7-1**.

### *Avaliação da atividade antimicrobiana*

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de micro diluição seriada, utilizando o meio de cultura Caldo Mueller-Hinton para bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose para as leveduras (*Candida albicans* e *C. parapsilosis*) e meio RPMI 1640 para os fungos dermatófitos (*Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*). Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo distribuídos 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura em cada poço, em seguida acrescentado 100  $\mu\text{L}$  do extrato bruto diluído em meio de cultura. Para o teste com as bactérias, as placas foram encubadas a 37°C por 24h. As placas contendo leveduras foram incubadas a 37°C por 48h. Já no caso dos dermatófitos, as placas foram incubadas em câmara úmida a 28°C por 72h. Após o tempo de incubação, as placas foram analisadas e a concentração inibitória mínima foi determinada. Após esse procedimento, transferiu-se 10  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços que apresentaram inibição do crescimento visível para placas de meio de cultura, e determinou-se a concentração bactericida ou fungicida do extrato.

### **Resultados e Discussão**

Depois de realizar os procedimentos de isolamento e purificação, foram obtidas 42 linhagens de fungos endofíticos de *C. laevigata*. Para a determinação da frequência de colonização (FC), avaliou-se o número de fragmentos que apresentaram crescimento fúngico (211) em relação ao número total de fragmentos amostrados (250). Desta forma com apenas 39 fragmentos que não apresentaram crescimento no total de 250 avaliados, foi encontrada uma frequência de colonização de 84,4%. A partir das análises macroscópicas desses fungos, foi possível alocá-los em 24 morfogrupos distintos, com base na cor da colônia e formato do micélio.

Após o cultivo do fungo CL7 em caldo BD obteve-se 115,3 mg de extrato bruto. No espectro de prótons da amostra CL7-EB observou a presença de poucos sinais, e segundo a integração destes, observou-se que havia a presença majoritária de apenas uma substância. Ao se observar o espectro de prótons da amostra CL7-OL observaram-se os mesmos sinais que a amostra CL7-EB, e desta forma pode-se determinar que ambas amostras apresentaram a mesma substância. Para a identificação da substância foram realizadas as demais análises de RMN. A substância codificada como **FCL7-1** foi identificada como sendo a 4-hidroximetil-5-hidroxi-2H-piran-2-ona. Identificação realizada pela comparação dos dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC e HSQC com os dados da literatura (LIN et al., 2008).

### Avaliação da atividade antimicrobiana

A partir da técnica de micro diluição em placa o valor da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto do fungo CL7 foi determinada, onde para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum* os valores de CIM foram maiores que a concentração testada de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Já para contra os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* o valor de CIM foi igual a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, porém a CBM/CFM foi superior a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, indicando que não houve morte dos microrganismos, mas apenas a inibição do seu crescimento. Dados da literatura consideram que extratos com valores de CIM de 500-1000 µg mL<sup>-1</sup> possuem uma atividade antimicrobiana fraca; acima de 1000 µg.mL<sup>-1</sup> o extrato pode ser considerado inativo. Dessa maneira, o extrato de metabólitos secundários do fungo CL7 não apresentou atividade antimicrobiana significativa.

### Conclusões

O estudo dos fungos endofíticos associados a espécie vegetal *C. laevigata* resultou no isolamento de 42 fungos endofíticos, que foram divididos em 24 morfogrupos distintos, de acordo com características macroscópicas. O estudo químico do extrato metabólico do fungo CL7 levou a identificação do composto 4-hidroximetil-5-hidroxi-2H-piran-2-ona. O extrato de metabólitos do fungo CL7 também foi testado frente a diferentes bactérias, leveduras e fungos dermatófitos, mas os resultados obtidos demonstram uma fraca ou inativa atividade antimicrobiana do extrato.

### Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação Araucária, a organização do evento e a Universidade Estadual de Maringá.

### Referências

AZEVEDO, J.L.;MACCHERONI Jr, W.;PEREIRA,J.O.;ARAUJO, W.L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**.v.3,n.1,15-16,2000.

LIN, A.; LU, X.; FANG, Y.; ZHU, T.; GU, Q.; ZHU, W. Two New 5-Hydroxy-2-pyrone Derivatives Isolated from a Marine-derived Fungus *Aspergillus flavus*. **The Journal of Antibiotics**. 61(4): 245–249, 2008.

PAMPHILE, J. A. & AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*L). **World Journal Microbiology & Biotechnology**,18,391-396, 2002.