

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO DO ENDÓFITO *Curvularia* sp. (G6-32) CONTRA A BACTÉRIA *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

Leonardo Hamamura Alves (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ricardo Schincariol Trugillo, Andressa Domingos Polli, João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: prof.pamphile@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia celular / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Multidisciplinar, Biotecnologia.

Palavras-chave: Biotecnologia, Compostos bioativos, Fungos endofíticos.

Resumo:

Micro-organismos endofíticos são aqueles que se encontram no interior das plantas em relação assintomática, alguns endófitos podem proteger seus hospedeiros de ataques de patógenos, seja pela competição por nutrientes, espaço ou produção de metabólitos secundários bioativos. Estes metabólitos apresentam uma variedade de aplicações biotecnológicas, devido às suas atividades antifúngicas, antibióticas, antitumorais, entre outras. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes meios de cultura na atividade do extrato bruto do endófito *Curvularia* sp. (G6-32) contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). Os extratos foram obtidos a partir de fermentação em diferentes meios e extração com acetato de etila. A atividade antibacteriana dos extratos fúngicos foi avaliada pelo método de microdiluição, verificando a concentração Inibitória Mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Os metabólitos produzidos em meios BD e MM apresentaram uma CIM entre $150 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para *S. aureus*, sendo a CBM evidenciada nas concentrações entre $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $2.000 \mu\text{g.ml}^{-1}$, sendo o BD pH7 e BD pH12 apresentando os melhores resultados. Desta forma, evidencia-se a importância do estudo dos endófitos como fontes de metabólitos bioativos de interesse biotecnológico.

Introdução

Micro-organismos endofíticos ou endófitos, como fungos e bactérias, encontram-se no interior dos tecidos ou órgãos vegetais em relação assintomática, ou seja, sem causar alteração fenotípica no hospedeiro. Podem aumentar a resistência das plantas contra estresses bióticos e abióticos, produzir hormônios de crescimento, antibióticos, enzimas e ajudar na obtenção de nutrientes a partir do meio ambiente, assim como outros compostos de interesse biotecnológico.

Polli (2016) verificou que o fungo endofítico *Curvularia* sp. (G6-32), previamente isolado de folhas de *S. saponaria*, e seu extrato bruto de

metabólitos contendo o composto (-)-Asperpentina apresentaram potencial biotecnológico no controle de fungos e bactérias patogênicas *in vitro*. Com base nesse potencial, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da mudança de meio de cultura e pH na produção dos extratos de metabólitos secundários deste endófito e sua atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Materiais e métodos

O fungo endofítico *Curvularia* sp. (G6-32) utilizado neste trabalho pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC/UEM). Para a obtenção dos metabólitos secundários foi utilizado meio de cultura BD (batata dextrose), MM (meio mínimo) e MM + (meio mínimo suplementado com 5% extrato de levedura e 5% casoaminoácido), com as respectivas alterações de pH (3, 7 e 12), totalizando nove tipos de cultivo. Em erlenmeyers com 250 mL de meio foram inoculados de 3 a 4 frações de 1 cm² do micélio fúngico previamente crescido e os mesmos foram incubados em condição estacionária por 21 dias à 28 °C.

Após esse período, foi realizada a filtração e centrifugação a 2.750 g durante 15 minutos para uma melhor separação de eventuais resíduos de micélio. Para a extração dos metabólitos secundários, foi realizada uma partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila em uma proporção de 1:5 (solvente:meio fermentado), sendo esta etapa repetida 3 vezes. A fase orgânica foi separada e concentrada em rotaevaporador, obtendo-se os extratos brutos de metabólitos secundários.

Para os ensaios de susceptibilidade antibacteriana foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), adquirida no banco de micro-organismos do laboratório de Microbiologia da Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. A atividade antibacteriana dos extratos brutos de metabólitos secundários do endófito *Curvularia* sp. (G6-32) foi realizada seguindo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a técnica CLSI M07-A9 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Os extratos brutos foram preparados na concentração de 8.000 µg.mL⁻¹ e foram utilizados os antibióticos vancomicina e tetraciclina na concentração inicial de 1.000 µg.mL⁻¹, sendo todos solubilizados em 5% de uma solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) em Caldo Mueller Hinton. Foi realizado o controle negativo da bactéria patogênica para avaliação da viabilidade celular. Com este ensaio foi obtida a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Resultados e Discussão

Foram obtidos rendimentos dos extratos de metabólitos em massa (mg) distintos em relação aos diferentes meios de cultura e pH. Ocorreu a variação entre o pH inicial e final nos meios de cultura estabelecidos após o crescimento fúngico (Tabela 1).

Tabela 1. Variação de pH e rendimento dos extratos brutos de metabólitos secundários do endófito *Curvularia* sp. (G6-32) em diferentes cultivos.

Meio de cultura	pH inicial	pH final	Rendimento metabólito (mg)
MM	3	7,86	0,9
MM	7	8,73	13
MM	12	8,67	16
MM +	3	8,18	9
MM +	7	8,70	13
MM +	12	9,05	20
BD	3	3,79	28
BD	7	6,40	68
BD	12	9,37	39

BD (batata dextrose), MM (meio mínimo) e MM + (meio mínimo suplementado com 5% extrato de levedura e 5% casoaminoácido)

Verificou-se que independentemente do meio utilizado, o micro-organismo tende a centralizar o pH a 8,0 após fermentação. Em meio BD houve menor variação entre o pH inicial e final, com melhor rendimento em massa, em comparação aos outros meios analisados. O extrato metabólito do meio de cultura MM pH3 não foi utilizado pois seu rendimento não foi significativo.

A partir do estudo da modificação dos meios de cultura e variações de pH, foi observado que a bactéria *S. aureus* foi mais sensível aos metabólitos produzidos nos meios BD e MM, apresentando uma CIM entre 150 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, e CBM nas concentrações entre 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 2.000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Os extratos brutos foram mais efetivos em crescimento fúngico nos meios BD pH 12, BD pH 7 e MM pH 12, com valores de CIM 150 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e CBM entre 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos brutos de metabólitos secundários do fungo endofítico *Curvularia* sp. (G6-32) contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Tratamentos	CIM($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	CBM($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	Média*	Redução **
MM pH 3	-	-	-	-
MM pH 7	500	2.000	4,62± 0,02	4,04
MM pH 12	250	1.000	5,49±0,05	3,17
MM+ pH 3	1.000	4.000	5,74±0,04	2,92
MM+ pH 7	2.000	>8.000	2,71±0,12	5,96
MM+ pH 12	8.000	>8.000	6,71±0,05	1,95
BD pH 3	500	2.000	5,81±0,04	2,85
BD pH 7	250	500	3,54±0,49	5,12
BD pH 12	150	250	3,65±0,22	5,01
Vancomicina	0,97	0,97	-	8,67
Controle negativo	-	-	8,67	-

BD (batata dextrose), MM (meio mínimo) e MM + (meio mínimo suplementado com 5% extrato de levedura e 5% casoaminoácido). * valores expressos em Log UFC.mL⁻¹. ** redução em Log UFC.mL⁻¹ em relação à CIM

Os resultados provenientes do extrato no cultivo MM+ indicam que pode ter ocorrido algum estresse entre os suplementos e a produção de metabólitos secundários desse fungo, apresentando menor capacidade de inibição em relação aos outros tratamentos.

Conclusões

Os extratos de metabólitos secundários do fungo endófito *Curvularia* sp., apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, obtendo-se melhores valores de CIM e CBM em BD pH 12. Assim, verifica-se o potencial deste endófito e seus metabólitos secundários, ressaltando a importância de novas pesquisas visando a otimização e aplicabilidade biotecnológica.

Agradecimentos

Ao CNPq e UEM.

Referências

Clinical and Laboratory Standards Institute. **CLSI document M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

POLLI, A. D. **Metabólitos secundários produzidos pelo fungo endófito *Curvularia* sp. (G6-32) isolado de folhas de *Sapindus saponaria* L. e atividade antimicrobiana.** Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Maringá, 2016.