ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *CARYOCAR BRASILIENSE* (PEQUI) CONTRA *CANDIDA ALBICANS* E *ESCHERICHIA COLI*.

Jéssica Caroline Santos de Moura¹, Joyce Rodrigues de Jesus¹, Odanir Garcia Guerra¹, Matheus Henrique Reis da Silva¹, Alex Martins Machado¹.

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Licenciatura em Ciências Biológicas, Três Lagoas, MS. E-mail: jessicamoura.bio15@gmail.com

RESUMO

Atualmente o estudo de fungos endofíticos vem contribuindo para obtenção de metabólitos secundários e bioativos de importância industrial e biotecnológica. Neste trabalho objetivou-se a avaliação da atividade antagonística de fungos endofíticos isolados do pequi *Candida albicans* e *Escherichia coli*. Para os experimentos foi realizada a técnica de cultura pareada, os patógenos e os isolados endofíticos foram colocados para crescer em meio BDA em polos opostos da placa. Os testes foram realizados em triplicata e incubados a 28°C. Foi realizado o cálculo do índice de antagonismo (IA) foi calculado para todos os endófitos testados e a análise das interações endofíticas foi baseada na escala de Badalyan. Os endófitos apresentaram índice de antagonismo entre 26,6% a 82,8% contra o patógeno *C. albicans* e um índice entre 40,4% a 93,7% contra o patógeno *E. coli*. Estes resultados evidenciam um grande potencial microbiano, de substâncias produzidas por estes fungos.

Palavras-chave: 1) Biotecnologia 2) Metabólitos secundários 3) Cerrado 4) Antagonismo fúngico 5) Controle biológico

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *CARYOCAR BRASILIENSE* (BRAZILIAN PEQUI FRUIT) AGAINST *CANDIDA ALBICANS* AND *ESCHERICHIA COLI*.

ABSTRACT

Nowadays the study of endophytic fungi has been contributing to obtain secondary and bioactive metabolites of industrial and biotechnological importance. The goal of this work was the evaluation of the antagonistic activity of endophytic fungi isolated from Brazilian Pequi fruit against *Candida albicans* and *Escherichia coli*. The experiments was performed using the paired culture technique, where the pathogens and the endophytic isolates were placed to grow in BDA medium at opposite poles of the plate. The tests were performed in triplicate and incubated at 28 ° C. The calculation of the antagonism index (AI) was performed for all endophytes and the analysis of endophytic interactions was based on the Badalyan scale. The endophytes presented an antagonistic index between 26.6% and 82.8% against the pathogen *C. albicans* and against the *E. coli* an index between 40.4% and 93.7%.

Keywords: 1) Biotechnology 2) secondary metabolites 3) Cerrado 4) Fungal Antagonism 5) Biological control

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e apresenta elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 11.627 espécies vasculares nativas (MENDONÇA *et al.*, 2008). Dentre as plantas do cerrado com potencial terapêutico, o *Caryocar brasiliense*, conhecido popularmente como pequi, é uma espécie bastante promissora e de extrema importância para o Bioma Cerrado. Estudos tem evidenciado, em seus compostos, alta capacidade de oxidação de radicais livres, constituindo uma alternativa viável de antioxidante natural (ROESLER *et al.*, 2007; ROESLER *et al.*, 2008).

A natureza tem sido fonte de medicamentos desde milênios com o uso de plantas medicinais e seus metabólitos secundários, tem sido de grande auxílio na cura de doenças (NEWMAN *et al.*, 2000). Neste contexto, uma fonte alternativa de prospecção de metabólitos secundários são os fungos endofíticos, os quais vem mostrando significativos resultados na obtenção de substâncias com capacidades curativas, com produção de compostos bioativos com diversas atividades de interesse médico/farmacêutico, como: atividades anticancerígena, antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiviral (VINING, 1990; JI *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2011; BI *et al.*, 2011; BRAKHAGE, 2013; ARUMUGAM *et al.*, 2014).

Inúmeras razões justificam a necessidade de encontrar novos agentes com capacidade antibiótica, desde o aumento das doenças infecciosas, segunda maior causa de mortalidade do mundo; aumento da resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; a diminuição do número de novos compostos antimicrobianos aprovados nos últimos anos; e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos encontrados atualmente (PAYNE *et al.*, 2007; COATES *et al.*, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou isolar fungos endofíticos de folhas de *Caryocar brasiliense*, no intuito de avaliar ação destes no controle biológico de patógenos como: *Candida albicans* e *Escherichia coli*, os quais, apesar de fazerem parte da microbiota humana e trazerem benefícios ao organismo, sob certas circunstâncias, podem causar sérias infecções, além de estarem no caso da bactéria *E. coli* relacionado a grande resistência a antimicrobianos (CORREIA *et al.*, 2007).

METODOLOGIA

Coleta do material vegetal, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

As amostras de folhas de *Caryocar brasiliense* foram coletadas em áreas previamente estabelecidas do município de Três Lagoas-MS, em 5 espécimes diferentes.

Cinco folhas aparentemente saudáveis, selecionadas de cada indivíduo, foram lavadas em água corrente para remoção de impurezas e, em seguida, colocadas sobre papel toalha para a retirada do excesso de água (SOUZA *et al.*, 2004). Posteriormente, as folhas foram submetidas ao processo de desinfecção superficial, seguindo protocolo padronizado por Araújo e colaboradores (2002) e Schulz & Boyle (2005).

Após o processo de desinfecção, cada folha foi cortada em fragmentos de 0,5 cm, sendo utilizados cinco fragmentos por placa. Foram utilizados três meios de cultura diferentes: ágar batata-dextrose (BDA, Acumedia), ágar malte 2% (MA2%, Acumedia) e ágar sabouraud, acrescido de cloranfenicol 0.1g/L. As amostras foram plaqueadas em triplicata, e incubadas a 28°C por 20 dias. As placas foram observadas diariamente e quando detectado crescimento, as mesmas foram purificadas por novo crescimento, procedendo a posterior preservação pelas técnicas de Castellani e criopreservação a -20°C, em glicerol 20%.

Identificação e caracterização dos isolados

Os isolados obtidos foram identificados por análises macroscópicas (aspectos gerais da colônia) e microscópicas (estruturas reprodutivas), sendo as estruturas observadas comparadas

com as encontradas em chaves taxonômicas clássicas (ELLIS, 1976; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1993; WATANABE, 2002). Culturas que não apresentaram estruturas de reprodução, foram submetidas a técnica de microcultivo para identificação das linhagens fúngicas, e ainda as que não foram identificados por este método, foram novamente cultivados em ágar aveia durante 30 dias a 27°C, para posterior observação e identificação.

Avaliação *in vitro* do antagonismo fúngico

Para o ensaio *in vitro* foi empregado o método de cultura pareada em disco de ágar adaptado de Silva *et al.* (2008). Para a realização da cultura pareada, foram utilizados nove fungos endofíticos isolados do pequi (*Caryocar brasiliense*), onde, um fragmento de 6mm² de cada um destes microrganismos foi inoculado em um meio BDA modificado por Pamphile (1997) e, no polo oposto da placa, foi inoculado, por esgotamento, o patógeno *E. coli* ou *C. albicans*, mantendo uma distância entre os dois micro-organismos testados (CAMPANILE *et al.*, 2007). Os testes foram realizados e mantidos a 27°C por sete dias na BOD. O Índice de Antagonismo (IA) foi calculado para todas as linhagens endofíticas testadas de acordo com a fórmula: $IA = (RM - rm) / RM \times 100$, onde: RM = média dos raio nas outras três direções e rm = raio da colônia em direção ao antagonismo. A análise das interações endófito-patógeno foi baseada na escala de Badalyan, de acordo com três tipos de interações: A, B e C (CA1, CA2, CB1 e CB2), onde, A: “deadlock” com contato micelial; B: “deadlock” à distância, C: crescimento do endofítico sobre o patógeno sem “deadlock” inicial; CA1 e CA2: crescimento parcial e completo do endofítico sobre o patógeno depois de “deadlock” inicial com contato micelial, CB1 e CB2: crescimento parcial e completo do endofítico sobre o patógeno depois de “deadlock” inicial à distância (BADALYAN *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Inicialmente, foram obtidos 70 fungos, que após purificação das culturas e triagem morfológica macro e microscópica foram agrupados em 20 morfotipos, sendo identificados apenas 3 taxons: *Aspergillus spp.*, *Curvularia lunata*, *Nigrospora spp.* não foi possível identificar morfolologicamente 18 dos morfotipos observados, devido principalmente a não esporulação dos fungos no meio de cultura utilizado. Os microrganismos utilizados neste trabalho foram os fungos endofíticos identificados e outros cinco fungos não identificados denominados: P4M81, P5M9, P1P81, PIS29 E P5P94.

(A) *Curvularia lunata* (B) *Aspergillus spp.* (C) *Nigrospora spp.*

Figura 1. Fungos endofíticos isolados das folhas de *Caryocar brasiliense*

Bioprospecção dos isolados fúngicos

Os isolados testados contra *Candida albicans* apresentaram IA entre 26,6% a 82,8%, sendo observado que o isolado *Aspergillus spp.* apresentou o maior índice de antagonismo (82,8%), seguido pela *Curvularia lunata* (68%), *Nigrospora spp* (60,6%) e os isolados não identificados que apresentaram IA menores. Análise pela escala de Badalyan mostrou que a maioria dos endófitos

apresentaram interação do tipo B, entretanto, o fungo *Aspergillus sp.* apresentou interação do tipo CA1, onde ocorreu a sobreposição parcial após o “deadlock” (Tabela 1)

Tabela 1. Índice de antagonismo e tipo de interação dos isolados contra o patógeno *C. albicans*

Isolados	Índice de Antagonismo (%)	Tipo de interação
<i>Aspergillus spp.</i>	82,8	CA1
<i>Curvularia lunata.</i>	68	B
<i>Nigrospora spp.</i>	60,6	B
P1S29	60,3	B
P1P81	54,2	B
P5M9	50	B
P4M81	35,1	B
P5P94	26,6	B

Os isolados testados contra o patógeno *E. coli* apresentaram um IA entre 40,4% a 93,7%, sendo que os isolados *Nigrospora spp.* e *Aspergillus spp.* apresentaram os maiores IA, 93,7% e 82,9%, respectivamente. Os isolados não identificados apresentaram novamente menores IAs. A análises pela escala de Badalyan mostrou que a maioria dos endófitos apresentaram interação do tipo B, entretanto, os fungos *Nigrospora spp.* e *Aspergillus spp.* apresentaram interação do tipo CA1, onde ocorreu a sobreposição parcial após o “deadlock” (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de antagonismo e tipo de interação dos isolados contra o patógeno *E. coli*

Isolados	Índice de Antagonismo (%)	Tipo de interação
<i>Nigrospora spp.</i>	93,7	CA1
<i>Aspergillus spp.</i>	82,9	CA1
P1S29	62,9	B
P5M9	60,6	B
P5P94	55,3	B
<i>Curvularia lunata.</i>	54,8	B
P1P81	44,7	B
P4M81	40,4	B

DISCUSSÃO

Na medicina popular, folhas e frutos do pequi são utilizados para tratamento de afecções respiratórias, oftalmológicas e hepáticas, e o óleo da polpa é amplamente usado como agente tônico contra asma, gripe, resfriado e doenças broncopulmonares (ROESLER *et al.*, 2007). As plantas medicinais habitualmente abrigam endófitos que apresentam metabólitos secundários e atividades medicinais semelhantes às de sua planta hospedeira (STROBEL e DAISY, 2003).

Assim, o isolamento de fungos endofíticos, bem como sua bioprospecção são de extrema importância para as indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, pois metabólitos provenientes destes organismos possuem ampla aplicação nas terapias humanas, incluindo antibióticos, antimicóticos e anticarcinogênicos (Bi *et al.*, 2011).

Bérdy (2005) evidenciou que *Aspergillus sp.* possuem uma produção estimada de mil tipos de antibióticos, tornando o gênero de fundamental importância para pesquisa de novos metabólitos potencialmente ativos, e corroborando com os achados deste trabalho, que evidenciou boa atividade inibitória deste fungo contra ambos patógenos.

Estudos realizados por Arumugam e colaboradores (2014), mostraram que o fungo *Nigrospora sp.* Possui ação bactericida e bacteriostática sobre as bactérias Gram positivas e Gram

negativas com concentrações variáveis, corroborando aos achados deste trabalho, onde este fungo apresentou IA elevado contra a bactéria Gram negativa *E. coli*.

Apesar de tratar-se de resultados preliminares, estes dados sugerem que os fungos isolados a partir do *C. brasiliense* possuem potencial na produção de metabólitos bioativos, porém, novos estudos são necessários com o propósito de isolar e caracterizar as moléculas responsáveis pelo papel antagônico destes fungos, permitindo um futuro uso destas moléculas nas diversas áreas biotecnológicas, bem como nas áreas farmacêuticas e médicas.

CONCLUSÃO

As folhas *C. brasiliense* apresentaram um painel de fungos endofíticos comuns a outras plantas medicinais. Fungos endofíticos presentes nestas plantas, e caracterizados como *Aspergillus sp.* e *Nigrospora sp.* apresentaram grande potencial antimicrobiano, mostrando que estes produzem substâncias com grande poder inibitório do crescimento microbiano, e que estudos de caracterização destas moléculas, são necessários, para determinar seu real potencial biotecnológico e aplicação.

REFERÊNCIAS

- ARUMUGAM, G.K. SRINIVASAN, S.K. JOSHI, G. GOPAL, D. RAMALINGAM, K. 2014. Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora sp.* in submerged fermentation. Journal of Applied Microbiology. 118: 99-111. <https://doi.org/10.1111/jam.12693>
- BADALYAN, S. M., et al.. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. PhytopathologiaMediterranea. 41, 200–225, 2002.
- BÉRDY J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot.; 58: 1-26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- BI, S.F., LI, F., SONG, Y.C., TAN, R.X., 2011. New acrylamide and oxazolidin derivatives from a termite-associated *Streptomyces sp.* Nat. Prod. Commun. 6, 353–355.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. Nature reviews. Microbiology, London, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.
- CAMPANILE, G., RUSCELLI, A., & LUISI, N. Antagonistic activity fo endophytic fungi towards *Diplodiadactylis* assessed by in vitro and in plant tests. Eur. J. PlantPatho., 117, 237-246, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9089-1>
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, May 1939.
- COATES, A.R.M; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. Br J Pharmacol. 2007 Dec; 152(8): 1147–1154. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707432>
- CORREIA, C. et al. Etiologia das infecções do trato urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. Departamento de diagnóstica e terapêutica. Acta medport v. 20 p. 543-549, 2007.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of Soil Fungi. 2.ed. Eching: IHW-Verlag, v.1, 1993. 860p.

GONÇALVES, M. A. P. Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo. 2014. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: ecologia e flora. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008. v2. 1279p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999). *Natural Product Reports*, London, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000. <https://doi.org/10.1039/a902202c>

PAMPFILE, J. A. Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens pathogenic fungi of cereals in dual culture. *PhytopathologiaMediterranea*. 41, 200–225, 2002.

PAYNE, D.J.; GWYNN, M.N.; HOLMES, D.J.; POMPLIANO, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):29-40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. Londres, v. 110, p. 711–717, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.048>

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27 (1): 53-60, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>

SHANKAR, B. et al. Biodiversity of endophytic fungi from seven herbaceous medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, southern India. *Journal of Forestry Research, China*, v. 25, n. 3, p. 707-711, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11676-014-0511-9>

SILVA, K. S; REBOUÇAS, T. N. H; BOMFIM, M. P; SILVA, D. S; SÃO JOSÉ, A. R; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma spp.* Ao fungo *Phytophthoracitrophthora*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n4p749>

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI F.S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogensbenthani*. *Acta Amazônica*. 2004. v.34, p.185-195. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>

STROBEL, G. et al. Isopestacin, a unique isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora* possessing antifungal and antioxidant properties. *Phytochemistry*, United Kingdom, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00062-6)

U'REN, J. M. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungal communities at a continental scale. *American Journal of Botany*, United States, v. 99, p. 898-91, 2012. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100459>

VINING, L. C. Functions of Secondary Metabolites. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 44, p. 395–427, 1990. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002143>

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. Natural Products Reports, v. 29, n. 6, p. 622-641, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2np00073c>