

ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Piper glabratum* Kunth

Kamyla Morais de Oliveira¹
Edilene Vilas Boas¹
Lucimar Pereira Bonett²
Euclides Lara Cardozo Júnior²
Juliana Bernardi-Wenzel²

OLIVEIRA, K. M. de; BOAS, E. V.; BONETT, L. P.; CARDOZO JÚNIOR, E. L.; BERNARDI-WENZEL, J. Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2015.

RESUMO: Devido a capacidade dos endófitos em colonizar diferentes espécies de plantas, inclusive as medicinais, produzindo substâncias de interesse biotecnológico como antibióticos, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos endofíticos de folhas de *Piper glabratum* Kunth e avaliar a atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas. O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado utilizando-se a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio 3%. Para avaliação da atividade antibacteriana, foi obtido extrato de 20 fungos endofíticos isolados que foram testados o extrato diretamente na fase aquosa, a fração obtida com acetato de etila e com clorofórmio P.A. Foi utilizado o teste de difusão em discos contra as bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Shigella flexneri*. Em placas de Petri com meio Muller Hinton (MH) contendo as bactérias foram inseridos quatro discos de papel estéreis inoculados com 10 µL de cada extrato metabólito. Avaliou-se a atividade antimicrobiana pela formação de halos de inibição. Foi possível isolar 98 de *P. glabratum*, com frequência de isolamento de 98%. Dentre os 20 fungos avaliados quanto a atividade antimicrobiana, catorze isolados apresentaram atividade antibacteriana para pelo menos uma das quatro bactérias patogênicas testadas, destacando-se potencial de inibição para a bactéria *S. aureus* a partir dos testes realizados diretamente com o extrato bruto e com acetato de etila.

PALAVRAS-CHAVE: Halo de inibição; Antibióticos; Resistência bacteriana; Prospecção.

ISOLATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Piper glabratum* Kunth ENDOPHYTIC FUNGI

ABSTRACT: Endophytes are able to colonize different species of plants, including medicinal plants, producing substances of biotechnological interest such as antibiotics. Therefore, the aim of this study was to isolate endophytic fungi from *Piper glabratum* Kunth leaves and evaluate the antibacterial activity against human pathogenic bacteria. The isolation of endophytic fungi was performed using the surface disinfection method with 3% sodium hypochlorite. In order to evaluate the antibacterial activity, extracts from 20 endophytic fungi were tested, with the extract directly into the aqueous phase and the fraction obtained with ethyl acetate and chloroform P.A. The method of disk diffusion was used against human pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica*. In Petri dishes with medium Muller Hinton (MH) containing bacteria, four sterile paper disks inoculated with 10 µL of each metabolite extract were inserted. The antimicrobial activity was evaluated due to the formation of the inhibition halo. It was possible to isolated 98 endophytic fungi from *P. glabratum* with isolation frequency of 98%. The results of the test showed that extracts from 20 endophytic fungi have inhibited the activity against fourteen isolates and antibacterial activity for at least one of the four tested pathogenic bacteria, emphasizing the potential for inhibition of *S. aureus* from the tests performed directly with the crude extract and ethyl acetate.

KEYWORDS: Inhibition halo; Antibiotics; Bacterial resistance; Prospection.

Introdução

As plantas medicinais são conhecidas por suas propriedades antimicrobiana e antioxidante e, embora sejam utilizadas pela humanidade há milênios, a comprovação de sua atividade farmacológica pela determinação de seus compostos e suas respectivas atividades vem sendo desenvolvida somente nas últimas décadas (HAIDA et al., 2007; TURRA et al., 2007; DESOTI et al., 2011).

Apesar da grande biodiversidade apresentada pelo Brasil, estima-se que até o início da década de 80, menos de 1% das espécies da flora brasileira tinham seu aspecto químico e farmacológico conhecido (FAZOLIN et al., 2007).

Dentre as plantas nativas do país, com atividade medicinal, estão as pertencentes a família Piperaceae, que possui aproximadamente 2.515 espécies, distribuídas em oito gêneros (MACHADO, 2007) e cerca de 1.000 espécies disseminadas no gênero *Piper*, sendo o maior número de espécies dentro desta família (GREIG, 2004).

Diversas espécies do gênero *Piper* são amplamente

utilizadas na medicina popular por produzirem compostos com propriedades biológicas e farmacológicas diversas, porém até 2004, apenas 10% das espécies de *Piper* foram fitoquimicamente estudadas (DYER; RICHARDS; DODSON, 2004). Este gênero se destaca pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, devido à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e também de inseticidas (MESQUITA et al., 2005).

Argondizo et al. (2007) em seu trabalho observaram por meio de estudos fitoquímicos com folhas de *P. glabratum* a ocorrência de um derivado do ácido benzóico prenilado e um cromeno. Já Flores et al. (2008) realizaram a elucidação estrutural de nove novos derivados de ácidos benzoicos produzidos pelas espécies *P. glabratum* e *P. acutifolium*, além de terem isolado quatro outros ácidos benzoicos já conhecidos, demonstrando que alguns desses compostos possuem ação antiparasitária contra promastigotas de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*.

Entre os compostos já isolados de *P. glabratum*

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v19i1.2015.5258>

¹Curso de Ciências Biológicas -UNIPAR Campus Toledo.

²Docente do Curso de Ciências Biológicas – UNIPAR Campus Toledo. Endereço para correspondência: Av. Parigot de Souza, 3636 – Jd. Prada, CEP 85903-170 – Toledo, Paraná, Brasil. Fone/Fax: (45) 3277-8500 ramal 273. E-mail: julianab@unipar.br

encontram-se também duas amidas pirrolidínicas, a 2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-trans-cinamoilpirrolidina, e 2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-ciscinamoilpirrolidina, presentes em extratos diclorometânicos de raízes de *P. glabratum* (VIEIRA; LOPES; CARDOZO JÚNIOR, 2009), sendo que a amida 2'-metoxi-4',5'-metilenedioxi-cinamoilpirrolidina quando avaliada demonstrou atividade diurética em ratos (BRESSAN et al., 2012).

Devido a suas características químicas, espécies de plantas com comprovada ação medicinal, representam um grupo de interesse para o isolamento de microrganismos endofíticos, que, embora as primeiras descrições sejam datadas de 1866 por Bary, só tiveram maior atenção ao seu potencial há cerca de 20 anos com a descoberta de suas capacidades biotecnológicas, principalmente na produção de fármacos e produtos industriais (AZEVEDO et al., 1998).

Os microrganismos endofíticos podem viver inter e intracelularmente nos tecidos vegetais e foram encontrados em praticamente todas as espécies de plantas já exploradas, apresentando incidência variável de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições sazonais e ecológicas (BLODGETT et al., 2007). Nesta associação de um endofítico com a planta pode haver benefícios ao vegetal, bem como induzir a produção de substâncias de interesse para uso terapêutico humano como a produção de medicamentos, já que a grande maioria dos antibióticos é produzida por microrganismos, especialmente fungos e bactérias (STROBEL et al., 2004).

A proporção de isolados endofíticos biologicamente ativos de diferentes fontes testados para atividade antimicrobiana em recentes estudos, mostra que o maior interesse tem sido devotado a busca de fungos endofíticos de plantas medicinais, correspondendo a 35% de todas as plantas estudadas, o que pode aumentar a chance da descoberta de novos compostos (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

Os compostos já descritos na literatura e produzidos por fungos endofíticos e que podem apresentar atividade biológica podem ser agrupados em diversas categorias, incluindo: alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides ligninas, fenol e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outros (ZHANG et al., 2006).

Em função da variedade de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por fungos endofíticos, a atividade de algumas plantas medicinais pode estar relacionada com os metabólitos que são produzidos por estes endofíticos, sendo assim a caracterização destes apresenta grande importância (AZEVEDO et al., 2002), principalmente devido ao aumento da resistência de bactérias e fungos que têm apresentado resistência a múltiplos antimicrobianos e representam um desafio no tratamento de infecções, o que foi alvo de um relatório divulgado este ano pela Organização Mundial da Saúde, (OMS) alertando sobre a possibilidade de epidemias futuras, caso medidas de controle contra microrganismos resistentes não sejam intensificadas (WHO, 2014).

A necessidade de uma exploração biotecnológica para identificar e caracterizar a biodiversidade microbiana é de suma importância, assim como o potencial químico dos metabólitos secundários extraídos desses microrganismos, especialmente os endofíticos, que podem ser uma fonte nova e alternativa de antimicrobianos. Dessa forma, este trabalho

teve como objetivo isolar fungos endofíticos de folhas de *Piper glabratum* Kunth e avaliar sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas.

Material e Método

Material vegetal e isolamento de endófitos

As folhas de *P. glabratum* foram coletadas no Refúgio Biológico Bela Vista na cidade de Foz do Iguaçu-Pr, em abril de 2013, e transportadas para o laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense em Toledo-PR em sacos estéreis. As exsiccatas dessas plantas encontram-se armazenadas no laboratório de Botânica da Universidade Paranaense, Unidade de Toledo.

Folhas com aparência saudável foram lavadas cuidadosamente em água corrente e enxaguadas com água destilada. No processo de desinfecção superficial foi utilizada a metodologia de Araújo et al. (2010). As folhas foram submergidas em solução Tween 80 a 0,01% para retirar a tensão superficial e foram enxaguadas com a água destilada autoclavada. Em seguida, foram levadas a câmara de fluxo laminar e desinfestadas com solução de álcool a 70%, sendo imersas por um minuto, sob agitação vigorosa e constante. Logo, após foi descartada a parte líquida, restando só as folhas e o procedimento foi repetido utilizando solução de hipoclorito de sódio 3% durante três minutos e solução de álcool a 70% por mais 30 segundos e enxágue de duas vezes com água destilada autoclavada. Uma pequena alíquota de 100 µL da água do último enxágue foi inoculada em placa de Petri como forma de controle negativo.

Concluída a desinfestação, as folhas de *P. glabratum* foram cortadas com bisturi em fragmentos de aproximadamente cinco milímetros. Foram distribuídos cinco fragmentos equidistantes em cada placa de Petri, contendo meio BDA, acrescido de 1g.L⁻¹ de terramicina para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. As placas foram incubadas por sete dias a uma temperatura de 26°C±2°C. Após o crescimento dos fungos, esses foram purificados em meio BDA, caracterizados e enumerados com código referente ao ponto de coleta (P1 ou P2), a espécie (Pg), seguidos de algarismos arábicos crescentes, de acordo com a ordem de isolamento (ex.: P1Pg01, P1Pg02 e assim sucessivamente).

Determinação da frequência de colonização

A frequência de colonização das folhas foi determinada pela fórmula: FC= número de fragmentos foliares com crescimento fúngico ÷ número de total de fragmentos amostrados x 100.

Extração dos metabólitos

Para obtenção de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia de Li et al. (2005), modificada. Os fungos foram semeados em meio líquido BD (batata dextrose) (SMITH; ONIONS, 1983), em erlenmeyers de 500 mL e incubados a 25°C por nove dias em agitador orbital com 160 rpm. O meio fermentado foi então coletado e centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e uma porção separada para o teste diretamente do meio fer-

mentado. O restante foi utilizado para obtenção das frações com acetato de etila e clorofórmio. O meio fermentado foi inserido em um funil de separação ao qual foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila P.A. O funil foi agitado e as fases foram separadas. A extração foi repetida mais duas vezes. O acetato de etila resultante da extração foi concentrado em evaporador rotativo a 50°C até a obtenção de 1 mL de material. Para obtenção da fração de extrato em clorofórmio foi realizado o mesmo procedimento.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada utilizando ensaios biológicos em triplicata. Os microrganismos utilizados no teste foram as bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani e Chalmers 1919 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus*, (ATCC 25923), *Salmonella enterica* (ATCC 19430) e *Shigella flexneri* Castellani e Chalmers 1919 (ATCC 12022).

Para os testes foi utilizada a técnica de difusão em disco dos extratos obtidos dos isolados endofíticos em acetato de etila, metanol e o próprio meio fermentado. As bactérias foram crescidas a 37°C por 24 horas em meio líquido LB (Luria Bertani) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), ajustadas a uma concentração de 10^6 células.mL⁻¹, utilizando a escala de MacFarland. Foram semeados 100 µL de cada bactéria em placas de Petri contendo meio MH (Muller Hinton) realizando-se o espalhamento. Posteriormente foram inseridos quatro discos papel Watman nº4 estéreis (Ø 6 mm), equidistantes, embebidos com 10 µL do extrato metabólito. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação e medida do halo de inibição, adaptado de Souza et al. (2004).

Análise estatística

Os resultados obtidos pela medida dos halos de inibição produzidos pelos extratos em relação as bactérias-teste foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey (p<0,05), utilizando o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Foi possível isolar 98 fungos endofíticos de *P. glabratum*, sendo estes classificados preliminarmente em morfogrupos distintos, obtendo-se 50 fungos com morfologia distinta. Não houve crescimento microbiano em nenhum dos controles negativos, comprovando o isolamento somente de fungos endofíticos. Quanto à frequência de isolamento, foi possível obter uma frequência de colonização de 98%. A quantidade de fungos endofíticos isolados, bem como a frequência de isolamento de fungos endofíticos, pode ser considerada elevada em relação a outras espécies. Costa Neto (2002) obteve frequência de isolamento de 23,9%, ao investigar microrganismos endofíticos de *Bactris gasipaes* Kunth. Bernardi-Wenzel et al. (2012) obtiveram 31 endófitos distintos de folhas de soja, indicando que a colonização de folhas de *P. glabratum* é bastante significativa. Os números de fungos endofíticos isolados de *P. glabratum* é semelhante ao número de isolados de plantas de pinha (110 isolados) e

graviola (90 isolados), obtidos por Silva et al. (2006). Além da quantidade de isolados semelhante, esses autores também obtiveram resultados semelhantes quanto a frequências de colonização que variou entre 74,8 e 100% para folhas de pinha e entre 54,8 e 100% para folhas de graviola, além de terem verificado que qualquer uma das partes da planta pode ser utilizada no processo de isolamento de fungos endofíticos, já que não houve diferença significativa na frequência de isolamento entre diferentes tecidos da mesma planta.

Em relação a atividade antimicrobiana, dos vinte extratos fúngicos testados, catorze apresentaram atividade antibacteriana para pelo menos uma bactéria patogênica humana quando obtidos a partir do acetato de etila, clorofórmio e com meio fermentado. A bactéria que demonstrou maior susceptibilidade aos extratos foi *S. aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva, sendo seguida de *E. coli* e *S. enterica* e *S. flexneri* (Gram-negativas), sendo que a última apresentou susceptibilidade somente a um dos extrato testados.

Dos extratos fúngicos extraídos com acetado de etila, um apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli*, um contra *S. enterica* e três contra *S. aureus*. Nenhum dos extratos obtidos com acetato de etila foi capaz de inibir o crescimento de *S. flexneri* (Tabela 1).

Tabela 1: Medidas dos halos de inibição (mm) de extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Piper glabratum* em acetato de etila, frente a bactérias patogênicas humanas.

Isolado	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
P1 Pg 01	11,20 ^{ab}	6,00 ^a	13,98 ^d	6,06 ^a
P1 Pg 02	6,78 ^{ab}	6,00 ^a	6,58 ^a	6,00 ^a
P1 Pg 03	9,28 ^{cd}	6,00 ^a	6,73 ^a	8,20 ^b
P1 Pg 04	6,60 ^{ab}	6,00 ^a	6,50 ^a	7,70 ^{ab}
P1 Pg 05	6,00 ^a	7,49 ^{abcd}	6,00 ^a	7,47 ^{ab}
P1 Pg 06	6,00 ^a	6,75 ^{abcd}	6,00 ^a	6,00 ^a
P1 Pg 07	7,42 ^{abc}	6,00 ^a	6,00 ^a	7,40 ^{ab}
P1 Pg 08	7,66 ^{abc}	8,36 ^{bcde}	9,30 ^{bc}	7,86 ^{ab}
P1 Pg 10	6,00 ^a	8,60 ^{de}	6,00 ^a	7,14 ^{ab}
P1 Pg 11	6,00 ^a	6,00 ^a	10,18 ^c	7,95 ^{ab}
P1 Pg 12	6,00 ^a	9,52 ^c	7,29 ^{ab}	6,00 ^a
P1 Pg 13	6,80 ^{ab}	7,57 ^{abcde}	8,27 ^{abc}	6,00 ^a
P1 Pg 14	8,05 ^{abc}	6,60 ^{abc}	8,32 ^{abc}	7,14 ^{ab}
P1 Pg 16	6,32 ^{ab}	7,82 ^{abcde}	7,27 ^{ab}	6,00 ^a
P1 Pg 17	9,34 ^{cd}	7,57 ^{abcde}	6,00 ^a	6,00 ^a
P2 Pg 01	6,00 ^a	8,24 ^{bcde}	7,36 ^{ab}	6,85 ^{ab}
P2 Pg 02	8,34 ^{abc}	6,00 ^a	8,12 ^{abc}	7,73 ^{ab}
P2 Pg 03	7,51 ^{abc}	7,50 ^{abcd}	7,55 ^{ab}	8,38 ^b
P2 Pg 04	8,61 ^{bc}	6,00 ^a	6,00 ^a	7,52 ^{ab}
P2 Pg 05	6,00 ^a	8,39 ^{cde}	6,00 ^a	6,00 ^a
Controle	7,34 ^{abc}	6,88 ^{ab}	7,12 ^a	7,54 ^{ab}
CV %	10,49	8,93	10,04	9,78
DMS	2,38	1,96	2,32	2,11

* médias representadas com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= coeficiente de variação e DMS = diferença mínima significativa.

Para os extratos fúngicos extraídos com clorofórmio P.A., dois apresentaram atividade contra *E. coli*, um contra *S. aureus* e um para *S. flexneri*. Para *E. coli* nenhum dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 2).

Tabela 2: Medidas dos halos de inibição (mm) de extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Piper glabratum* em clorofórmio P.A., frente a bactérias patogênicas humanas.

Isolado	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
P1 Pg 01	9,45 ^{cd}	8,11 ^{bc}	7,65 ^{bcd}	6,00 ^a
P1 Pg 02	7,30 ^{abc}	6,00 ^a	9,61 ^c	7,73 ^{abcd}
P1 Pg 03	6,00 ^a	9,12 ^c	6,62 ^{abc}	9,24 ^d
P1 Pg 04	13,99 ^c	6,00 ^a	6,00 ^a	8,24 ^{bcd}
P1 Pg 05	6,00 ^a	7,62 ^{abc}	6,00 ^a	7,90 ^{bcd}
P1 Pg 06	6,00 ^a	6,30 ^a	6,00 ^a	6,72 ^{ab}
P1 Pg 07	10,52 ^d	7,14 ^{ab}	6,00 ^a	7,86 ^{abcd}
P1 Pg 08	8,60 ^{bcd}	6,00 ^a	7,33 ^{abcd}	11,98 ^c
P1 Pg 10	7,51 ^{abc}	8,27 ^{bc}	7,83 ^{cd}	6,00 ^a
P1 Pg 11	6,38 ^{ab}	8,45 ^{bc}	8,41 ^{de}	8,33 ^{bcd}
P1 Pg 12	7,39 ^{abc}	7,08 ^{ab}	6,61 ^{abc}	8,46 ^{bcd}
P1 Pg 13	7,83 ^{abc}	7,24 ^{ab}	7,87 ^{cd}	8,00 ^{bcd}
P1 Pg 14	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a
P1 Pg 16	7,71 ^{bc}	7,24 ^{ab}	6,90 ^{abcd}	8,42 ^{bcd}
P1 Pg 17	6,00 ^a	7,51 ^{abc}	6,00 ^a	6,00 ^a
P2 Pg 01	6,00 ^a	7,35 ^{ab}	7,98 ^{cd}	7,36 ^{abc}
P2 Pg 02	8,04 ^{abc}	6,00 ^a	6,00 ^a	7,03 ^{ab}
P2 Pg 03	8,37 ^{abcd}	8,64 ^{bc}	6,17 ^{ab}	8,97 ^{cd}
P2 Pg 04	6,00 ^a	8,18 ^{bc}	6,00 ^a	7,85 ^{abcd}
P2 Pg 05	7,40 ^{abc}	8,77 ^{bc}	6,00 ^a	7,60 ^{abcd}
Controle	6,99 ^{abc}	7,35 ^{abc}	7,64 ^{bcd}	8,15 ^{bcd}
CV %	10,46	7,72	7,48	7,74
DMS	2,46	1,76	1,60	1,87

* médias representadas com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= coeficiente de variação e DMS = diferença mínima significativa.

Dentre os extratos fúngicos obtidos diretamente do meio fermentado, houve maior número bactérias susceptíveis, sendo que quatro extratos demonstraram atividade antimicrobiana significativos contra *E. coli*, seis contra *S. enterica* e quatro para *S. aureus*. Para *S. flexneri* nenhum dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Tabela 3: Medidas dos halos de inibição (mm) de extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Piper glabratum* em meio fermentado, frente a bactérias patogênicas humanas.

Isolado	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella flexneri</i>
P1 Pg 01	8,99 ^{de}	6,00 ^a	12,50 ^f	6,33 ^{ab}
P1 Pg 02	6,00 ^a	7,22 ^{abcdef}	7,89 ^{abc}	6,58 ^{ab}
P1 Pg 03	7,90 ^{abcde}	6,00 ^a	6,51 ^{ab}	9,38 ^d
P1 Pg 04	6,00 ^a	6,31 ^{abc}	6,00 ^a	7,22 ^{abc}
P1 Pg 05	6,00 ^a	7,67 ^{abcdef}	6,00 ^a	7,34 ^{abc}
P1 Pg 06	6,00 ^a	7,10 ^{abcde}	6,00 ^a	6,59 ^{ab}
P1 Pg 07	8,38 ^{bde}	6,00 ^a	6,00 ^a	7,16 ^{abc}
P1 Pg 08	7,13 ^{abcd}	7,03 ^{abcde}	7,33 ^{abc}	8,76 ^{cd}
P1 Pg 10	7,77 ^{abcde}	6,96 ^{abcde}	10,33 ^{def}	7,52 ^{abcd}
P1 Pg 11	6,87 ^{abc}	8,42 ^{def}	10,67 ^{ef}	6,22 ^a
P1 Pg 12	7,40 ^{abcde}	7,56 ^{abcdef}	8,64 ^{bde}	6,00 ^a
P1 Pg 13	7,59 ^{abcde}	7,61 ^{abcdef}	8,32 ^{ab}	6,52 ^{ab}
P1 Pg 14	8,50 ^{bde}	7,23 ^{abcdef}	8,72 ^{bde}	7,50 ^{abcd}
P1 Pg 16	7,00 ^{abcd}	6,40 ^{abcd}	6,90 ^{abc}	7,50 ^{abcd}
P1 Pg 17	7,23 ^{abcd}	8,57 ^{ef}	7,32 ^{abc}	6,00 ^a
P2 Pg 01	8,66 ^{cde}	9,27 ^f	8,23 ^{abcde}	6,00 ^a
P2 Pg 02	9,30 ^c	8,20 ^{def}	9,00 ^{cde}	7,13 ^{abc}
P2 Pg 03	8,10 ^{bde}	8,46 ^{def}	7,14 ^{abc}	6,97 ^{abc}
P2 Pg 04	9,33 ^c	8,16 ^{bcddef}	8,01 ^{abcd}	8,19 ^{bcd}
P2 Pg 05	6,00 ^a	8,52 ^{ef}	7,79 ^{abc}	6,60 ^{ab}
Controle	6,45 ^{ab}	6,10 ^{ab}	6,40 ^{ab}	7,48 ^{abcd}
CV %	8,84	9,00	9,59	8,63
DMS	2,04	2,06	2,35	1,90

* médias representadas com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= coeficiente de variação e DMS = diferença mínima significativa.

Embora alguns extratos endofíticos tenham apresentado atividade antimicrobiana significativa em relação ao controle, considerando-se o diâmetro do disco de 6,0 mm, os halos de inibição obtidos, que variaram entre 6,0 e 13,98 mm para acetato de etila, entre 6,0 e 13,99 mm para clorofórmio e entre 6,0 a 12,50 mm para o meio fermentado, os extratos não apresentaram diâmetro acentuado em relação ao controle. Em outros trabalhos, como de Jayanthi et al. (2011), avaliando a atividade antimicrobiana do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. GJJM07 isolado da planta medicinal *Mesua ferrea* L. em acetato de etila contra as bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, gram-negativas *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e a levedura *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923, obtiveram halos de inibição maiores do que do presente trabalho, sendo de 16 mm para *E. coli* *K. pneumoniae*, 18 mm para *B. Subtilis* e 12 mm para *M. luteuse* *C. albicans*, o que pode ser um indicativo de pouca concentração do composto obtido para os testes, já que estes foram concentrados de aproximadamente 50 mL de meio fermentado, podendo apresentar maior atividade se concentrados.

Foi possível observar maior atividade antimicrobia-

na com os extratos obtidos diretamente do meio fermentado, sendo catorze resultados para atividade antibacteriana, seguindo dos extratos extraídos com acetato de etila com cinco contra as bactérias testadas. Já os extratos fúngicos extraídos com clorofórmio P.A. apresentaram-se menos efetivos quanto a atividade antibacteriana, com apenas quatro fungos apresentando atividade antimicrobiana estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Este fato se deve provavelmente as características químicas de polaridade e solubilidade dos compostos presentes nos metabólitos secundários dos fungos endofíticos de *P. glabratum*.

O acetato de etila é um solvente menos polar do que a água, possibilitando a separação de compostos diferentes, sendo que os principais metabólitos secundários presentes em plantas, obtidos em acetato, são os flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral (MIGUEL et al., 1996), que podem também estar presentes nos metabólitos obtidos dos fungos endofíticos isolados neste trabalho. O clorofórmio permite principalmente a extração de compostos com baixa polaridade como os alcalóides, sendo que tanto compostos obtidos em clorofórmio quanto em acetato de etila podem apresentar também potencial antioxidante, podendo ser utilizados para a produção de medicamentos (SANTOS; MINGUZZI, 2010).

Extratos obtidos de alguns fungos endofíticos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em mais de um solvente testado como, por exemplo, PIPg1e PIPg11 que apresentaram atividade antimicrobiana quando obtidos a partir do meio fermentado e acetato de etila, PIPg8 em acetato de etila e clorofórmio, o que indica que um mesmo fungo endofítico pode produzir diferentes tipos de compostos com atividade antimicrobiana. Segundo Campos (2006) a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos presentes em espécies de plantas da família *Piperaceae* tem sido associada à presença de amidas, óleos essenciais, lignanas, alcaloides, fenilpropanoides, neolignanas e cromeno, o que justifica a presença de atividade antimicrobiana para os metabólitos extraídos com os três diferentes solventes.

A ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados da planta *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi), pertencente ao mesmo gênero de planta do presente trabalho foi verificada por Orlandelli et al. (2012), no qual os extratos de quatro endófitos extraídos com acetato de etila apresentaram maior efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, sendo que todos os metabólitos testados apresentaram ação contra a bactéria.

Garcia et al. (2012) encontraram resultados muito semelhantes aos do presente trabalho, em que metabólitos de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Sapindus saponaria* L. apresentaram maior atividade antimicrobiana quando obtidos em acetato de etila e diretamente do meio fermentado, contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930, *M. luteus* e *Enterococcus hirae* Farrow and Collins 1985. Estes resultados também estão de acordo com os apresentados no trabalho de Bernardi-Wenzel et al. (2013) que testando a ação antibacteriana de fungos endofíticos isolados de soja em relação as bactérias patogênicas *E.coli*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. flexnerie* *M. luteus* obtiveram resultados significativos em relação ao controle para os testes realizados com acetato de etila e meio fermentado, sendo que de vinte e três extratos testan-

do nove apresentam ação antibacteriana, reforçando que os compostos produzidos por fungos endofíticos com atividade antibacteriana podem ser obtidos com maior frequência nestes dois solventes.

Já Souza et al. (2004) que isolaram 79 fungos endofíticos das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* DC. E *Strychnos cogens* Benth e testaram o potencial antimicrobiano dos metabólitos destes fungos, verificaram que 19 inibiram pelo menos, um dos microrganismos patogênicos testados, sendo estes: *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923, *Trichoderma SP spirale* Bissett 1992., e *Aspergillus flavus* (Sakag. K. Yamada) Nehira 1957.

Phongpaichit et al. (2006) isolaram 377 fungos endofíticos de cinco espécies de plantas medicinais do gênero *Garcinia* e testaram a atividade biológica dos isolados extraídos com acetato de etila contra os microrganismos *S. aureus*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923, *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045) e *Microsporium gypseu* (ATCC 24102), verificando sua atividade antimicrobiana, que posteriormente Phongpaichit et al. (2007) realizando novos testes com sessenta e cinco destes isolados das mesmas plantas e obtiveram 80% de resultados positivos para atividade destes metabólitos em testes citotóxicos, antibacterianos, antivirais, antimalárico, antioxidante e carcinogênico.

Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos endofíticos, como antimicrobianos e antioxidantes são de extrema importância como novas fontes de produtos de interesse industrial e biotecnológico, sendo que sua identificação e caracterização química devem ser realizadas a fim de proporcionar maior conhecimento sobre a atividade destes compostos (SPECIAN et al., 2012).

Conclusão

Os resultados deste trabalho confirmam o potencial de fungos endofíticos como produtores de compostos com atividade antimicrobiana, já que metabólitos obtidos a partir de isolados endofíticos em acetato de etila, meio fermentado e clorofórmio foram capazes de inibir o crescimento das bactérias patogênicas humanas testadas. Estudos mais aprofundados com isolamento e identificação dos compostos biologicamente ativos desses fungos endofíticos serão conduzidos para que seu potencial possa ser totalmente explorado.

Agradecimentos

À Universidade Paranaense – UNIPAR, pelo apoio financeiro.

Referências

ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiology Research**, v. 169, n. 7-8, p. 483-495, 2014.

ARAÚJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010.

- ARGONDIZO, F. et al. Constituintes químicos de *Piper glabratum* Kunth (Piperaceae). **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 30.; 2007.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: _____. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 1998. p. 117-137.
- AZEVEDO, J. L. et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p. 269-294.
- BERNARDI-WENZEL, J. et al. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Sabios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2012.
- BERNARDI-WENZEL, J. et al. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolado de soja. **Perspectivas on line: Biologia e saúde**, v. 9, n. 3, p. 01-15, 2013.
- BLODGETT, J. T. et al. Soil amendments and watering influence the incidence of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* in South Africa. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 311-318, 2007.
- BRESSAN, J. et al. Atividade diurética do extrato bruto e amida pirrolidinica de *Piper glabratum* Kunth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves, 2012.
- CAMPOS, M. P. **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum* (Piperaceae)**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.
- COSTA-NETO, P. Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- DESOTI, V. C. et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.
- DYER, L. A.; RICHARDS, J.; DODSON, C. D. **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution**. Dyer, L. A.; Palmer, A. D. N.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004.
- FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. D. C.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebriomolitos* L., 1758. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORES, N. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-1543, 2008.
- GARCIA, A. et al. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 22, n. 10, p. 035-040, 2012.
- GREIG, N. Introduction. In: DYER, L. A.; PALMER, A. **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, p. 1-4, 2004.
- HAIDA, K. S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.
- JAYANTHI, G. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. GJJM07 isolated from *Mesua ferrea*. **International Journal of Current Science**, v. 1, p. 85-90, 2011.
- LI, H. et al. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515-1519, 2005.
- MACHADO, N. S. O. **Estudo da anatomia foliar de espécies do gênero *Piper* L. (Piperaceae) no estado do Rio de Janeiro**. 2007. 103 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- MESQUITA, J. M. O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 6-12, 2005.
- MIGUEL, O. G. et al. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Médica**, v. 62, p. 146, 1996.
- ORLANDELLI, R. C. et al. *In vitro* antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 137-141, 2012.
- PHONGPAICHIT, S. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 367-372, 2006.
- PHONGPAICHIT, S. et al. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants.

FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 51, p. 517-525, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, C. R. Z.; MINGUZZI, S. Estudo químico das sementes e frutos da *Jatropha gossypifolia* L. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS, 13., 2010, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2010.

SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 03, p. 649-655, 2006.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Page Bros, Norwick. 1983.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogensbentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SPECIAN, V. et al. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1174-1182, 2012.

STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TURRA, A. F. et al. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

VIEIRA, J. A. C.; LOPES, J. F.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Estudo químico de *Piper glabratum* Kunth nativa do Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 7., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2009. CD-ROM.

WHO (World Health Organization) **Antimicrobial resistance**. Global Report on Surveillance. Geneva: Switzerland, 2014.

ZHANG, C. L. et al. Clavatul and patulin formation as the antagonistic principle of *Aspergillus clavatonanicus*, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 833-840, 2008.

Recebido: 29/05/2014

Aceito: 04/02/2015