

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON

Sideney Becker Onofre \*

Raul Riveros \*\*

Sérgio Olavo Pinto da Costa \*\*\*

Neiva Monteiro de Barros \*\*

ONOFRE, S. B.; RIVEROS, R.; COSTA, S. O. P.; BARROS, N. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Sanson. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 3(1): 29-33, 1999.

**RESUMO:** Metabólitos do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* produzidos em culturas submersas em caldo Sabouraud sacarose extrato de levedura foram extraídos com diclorometano. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em coluna e em camada espessa de fluxo contínuo utilizando benzeno-clorofórmio-acetato de etila 18:1:1 (v:v:v) como eluentes. Amostras de *Saccharomyces cerevisiae* e de bactérias (18 cepas hospitalares e 5 estirpes fitopatogênicas) foram testadas frente ao metabólito empregando-se o método de difusão em ágar pelo sistema de discos (Kirby-Bauer). Aproximadamente 40% (9/23) das amostras bacterianas ensaiadas tiveram seu crescimento inibido na presença do metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*, sugerindo uma possível atividade antibacteriana deste metabólito.

**PALAVRAS-CHAVE:** atividade antimicrobiana; efeitos tóxicos; extratos; *Nomuraea rileyi*; metabólitos secundários.

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF METABOLITES PRODUCED BY THE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON FUNGUS

ONOFRE, S. B.; RIVEROS, R.; COSTA, S. O. P.; BARROS, N. M. Antimicrobial activity evaluation of metabolites produced by the *Nomuraea rileyi* (Farlow) samson fungus. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 3(1): 29-33, 1999.

**ABSTRACT:** Toxic metabolites of the entomopathogenical fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson produced in vitro in submerged cultures were extracted with dichloromethane from the culture medium (Sabouraud saccharose plus yeast extract). Cured extract was fractionated by column chromatography and continuous flow thick layer chromatography using benzene-chlorophorm-ethyl acetate 18:1:1 (v:v:v) as eluents. *Saccharomyces cerevisiae* and strains (18 hospital samples and 5 fitopathogenical samples) were tested facing the metabolite using the agar-diffusion method by the disc system (Kirby-Bauer method). Nearly 40% (9/23) of the bacterial strains analyzed had their growth inhibited in the presence of the metabolite produced by the fungus *Nomuraea rileyi*, suggesting a possible antibacterial activity of this metabolite.

**KEY WORDS:** antimicrobial activity; extract; metabolites activity; *Nomuraea rileyi*; toxic effects.

#### Introdução

Um grande número de fungos são conhecidos como produtores de metabólitos secundários, ativos sobre diversos organismos vivos, provocando inibição de crescimento, doenças e posteriormente sua morte. Dentre esses metabólitos, destacamos as aflatoxinas produzidas por linhagens de *Aspergillus flavus* (DIENER &

DAVIS, 1969), ochratoxina de *Aspergillus ochraceus* (KODAIRA, 1961; MYOKEY *et al.*, 1969); e várias toxinas e antibióticos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* (MYOKEY *et al.*, 1969). Vários fungos entomopatogênicos também são produtores de metabólitos com ação sobre microrganismos e insetos, dentre eles o fungo *Metarhizium anisopliae* produz um

\* Biólogo, Mestre em Biotecnologia, Professor Assistente de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - Unidade de Ensino de Pato Branco.

\*\* Professor Titular do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

\*\*\* Professor Titular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Sideney Becker Onofre. Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. Rod. PR 469, Km 01. Pato Branco - PR. 85503-390. E-mail: becker@cefet.whiteduck.com.br

ciclodipepsipeptídeo denominado destruxina, ativo sobre insetos que inibe o crescimento de diversas linhagens de bactérias (KODAIRA, 1969; CRISAN, 1971; KAIJIANG & ROBERTS, 1986; DUMAS *et al.*, 1995; CIANCIO, 1996). Os fungos *Beauveria bassiana*, *Peacilomyces fumoso-roseus*, *Fusarium moniliforme*, também produzem ciclodipepsipeptídeos beauvericina e o complexo enniatina (WEST & BUGGS, 1968; BERNARDINI *et al.*, 1975; GROVE & POPLE, 1980; RICHARD *et al.*, 1995; JEGOROV *et al.*, 1995; LOGRIECO *et al.*, 1996).

O fungo *Nomuraea rileyi* é encontrado naturalmente em diversas culturas, especialmente a soja, infectando a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Diversos estudos mostraram que o fungo *Nomuraea rileyi* é um produtor de metabólitos ativos sobre insetos e microrganismos (MYKUMI & KAWAKAMI, 1975; IGNOFFO *et al.*, 1976; WASTI & HARTMANN, 1978; MOHAMED & NELSON, 1984). Posteriormente, trabalhos de YE *et al.*, (1993) mostraram atividade destes metabólitos sobre larvas de *Bombyx mori*.

O propósito deste trabalho foi verificar a produção de metabólitos ativos pelo fungo *Nomuraea rileyi*, sua atividade antimicrobiana, sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

## Material e Método

### Fungo utilizado

*Nomuraea rileyi*, linhagem SA-86101, procedente da coleção de fungos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, RS, isolado da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*.

### Meio de cultivo

Foi utilizado o caldo Sabouraud sacarose adicionado de extrato de levedura, preparado de acordo com a seguinte fórmula: peptona 10g (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA); sacarose 40g (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) extrato de levedura 5g (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA); água destilada 1000 ml. Após a dissolução dos ingredientes por aquecimento, o pH do meio foi ajustado para 6. Volumes de 12 litros do meio de cultivo foram preparados em fermentadores com capacidade de 18 litros, acondicionados e esterilizados na autoclave a

121°C durante uma hora.

### Fermentação e isolamento dos metabólitos

O meio de cultivo foi inoculado com 200 ml de uma suspensão de esporos de *Nomuraea rileyi* (linhagem SA-86101) contendo  $5,4 \times 10^9$  conídios/ml. O cultivo foi mantido em condições controladas de temperatura  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e aeração constante por 12 dias. A seguir, o meio de cultura foi filtrado em Büchner sobre papel filtro Whatman nº 1, desprezando-se o micélio. Os metabólitos produzidos foram separados num extrator líquido/líquido, utilizando-se meio de cultivo-diclorometano na proporção 10:1 (v:v), os quais foram concentrados em evaporador rotativo (Büchi R110, Alemanha) a uma temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , obtendo-se (135mg/l). O resíduo contendo metabólitos mais impurezas foi passado através de uma coluna contendo sílica gel GF254 (Merck, Alemanha), na proporção de 100:1 (peso/peso). Benzeno e benzeno contendo quantidades crescentes de acetato de etila (5, 10, 25, 50%), foram usados como eluentes no fluxo de 1 ml/minuto.

Frações de cinco mililitros foram coletados. Cada fração foi examinada em cromatografia de camada delgada. O sistema de solventes utilizados foi benzeno : clorofórmio : acetato de etila, 18:1:1 (v:v:v), e aquelas frações que continham as mesmas características foram agrupadas após evaporação a vácuo e analisadas em espectrofotômetro de infravermelho (Impact-4000 Nicolet®, Brasil). Para remover outras substâncias, uma pequena quantidade de éter de petróleo foi adicionada aos cristais. O solvente foi descartado após permanecer no congelador por um período de 4 horas a uma temperatura de  $0^\circ\text{C}$ . Após a separação, o metabólito foi armazenado a uma temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análise da atividade biológica.

### Atividade antimicrobiana

Os extratos diclorometânicos obtidos, foram testados pelo método de difusão em ágar pelo sistema de discos (VANDEPITTE *et al.*, 1994) frente a 18 amostras de bactérias de origem hospitalar representadas por: *Serratia mercensens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*,

*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativa, *Bacillus subtilis*, *Providencia* sp., *Sarcina lutea* e *Enterobacter aerogene* além de cinco cepas de bactérias fitopatogênicas, incluindo *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas phaseoli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas corrugata* e *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Adicionalmente, foram testadas amostras de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de origem enológicas. Os discos de papel filtro foram inoculados com 4 ml de extrato diclorometânico com concentração de 1:1 metabólito: diclorometano (v.v). Em paralelo, como controle, utilizou-se também discos de papel filtro impregnados com 4 ml de diclorometano. As bactérias foram testadas no meio de Mueller Hinton (Merck - Alemanha) e as leveduras no meio YEPD - peptona, dextrose, extrato de levedura (Merck, Alemanha). Após a semeadura, as placas foram incubadas na estufa a 37°C (bactérias hospitalares) ou a 27°C (bactérias fitopatogênicas e leveduras).

### Resultados e discussões

Em nosso estudo foram obtidos 268 mg de metabólito em 34 litros de meio (7,88 mg/ml de meio). Utilizando-se a metodologia descrita, obteve-se 283,68 mg de metabólito em 36 litros de meio de cultura, resultando em 7,4 mg/ml de meio. As análises de espectrofotometria em infravermelho indicaram a presença de uma substância pura, pois a faixa do espectro apresentou na sua região de 700-1500 nm bandas estreitas e definidas, indicando a pureza do metabólito obtido (Figura 1).

O metabólito produzido pelo *Nomuraea rileyi* apresentou ponto de fusão de 244°C, similar ao ponto de fusão encontrado em outros metabólitos, como por exemplo a destruxina, 233,8°C (KODAIRA, 1962); beauvericina 248°C (HAMIL *et al.*, 1969). O valor de  $\eta_{sp}/c$  encontrado foi de 0,37.

O metabólito inibiu o crescimento de 7/18 (39%) das amostras de bactérias de origem hospitalar e de 2/5 (40%) das cepas bacterianas

fitopatogênicas, conforme mostrado na Tabela 1. Não foi verificada atividade antimicrobiana do metabólito sobre amostras de leveduras ensaiadas. Esse dado pode apresentar significância se considerarmos que as leveduras são usualmente empregadas como padrões nos testes toxicológicos de células superiores (AMES, 1989). O metabólito provocou halos de inibição em bactérias de origem hospitalares, bem como sobre as bactérias fitopatogênicas conforme Tabela 1.

Embora a técnica de difusão em ágar usado em nosso estudo seja um método qualitativo, os resultados sugerem que o metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* pode possuir ação antibacteriana. Entretanto, a confirmação desta atividade antibacteriana somente poderá ser feita utilizando-se de um método quantitativo, como por exemplo a determinação da concentração inibitória mínima. De certa forma nossos resultados coincidem com trabalhos realizados com metabólitos produzidos por outros fungos da mesma família tais como *Beauveria bassiana* (HAMIL *et al.*, 1969) onde mostrou a atividade do ciclohexadipepsipeptídeos beauvericina sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*; as atividades antimicrobianas do complexo enniatina e valinomicina, ambos ciclodipepsipeptídeos produzidos pelos fungos do gênero, *Beauveria*, *Fusarium* e *Peecilomyces* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também descritas (OVCHNNIKOV, 1974). Outros estudos mais recentes também mostraram a atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por fungos (JEGOROV *et al.*, 1995; LOGRIECO *et al.*, 1996; SEO *et al.*, 1996). Os dados observados, em relação a análise do espectrofotômetro de infravermelho (Figura 1) e ultravioleta, sugerem que o presente metabólito é um oligopeptídeo. Esses resultados coincidem com metabólitos produzidos por fungos também entomopatogênicos, onde esses metabólitos apresentam certa semelhança com relação aos picos (HAMIL *et al.*, 1969).

**TABELA 1** - Efeito do metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* sobre bactérias hospitalares e fitopatogênicas.

Amostras bacterianas testadas	Diâmetro em mm do halo de inibição do crescimento bacteriano <sup>1</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>2</sup>	29,0 ± 3,0
<i>Sarcina lutea</i> <sup>2</sup>	15,6 ± 3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>2</sup>	24,6 ± 6,5
<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>2</sup>	17,6 ± 3,9
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>2</sup>	19,0 ± 3,0
<i>Providencia sp</i> <sup>2</sup>	33,6 ± 6,6
<i>Pseudomonas solanacearum</i> <sup>3</sup>	27,0 ± 5,5
<i>Xanthomonas campestris pv pruni</i> <sup>3</sup>	11,0 ± 3,0

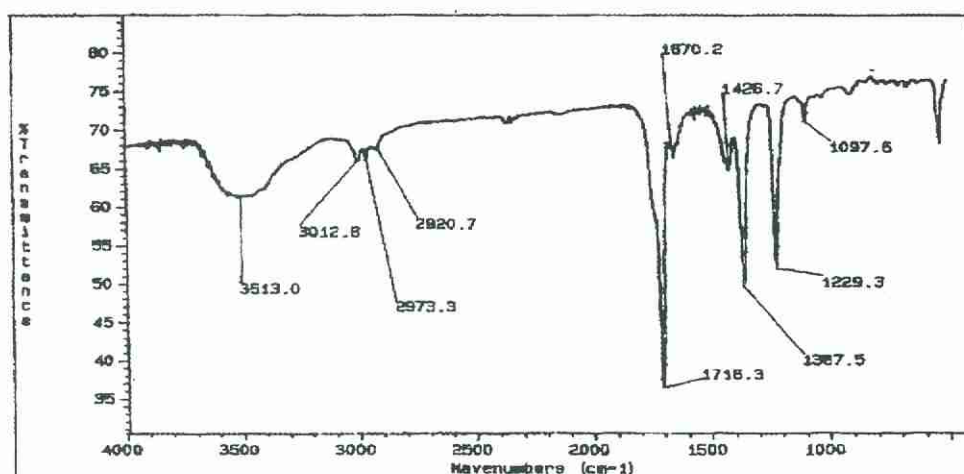
1. Método de difusão em ágar pelo sistema de discos (Kirby-Bauer).

2. Cepas hospitalares

3. Linhagens fitopatogênicas

Estudos posteriores em nosso laboratório devem ser realizados no sentido de melhor caracterizar a estrutura química do metabólito

produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*, assim como confirmar sua possível atividade antibacteriana.

**FIGURA 1** - Espectrometria de infravermelho da fração cristalizada do metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*.

### Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, por fornecer as bactérias de origem hospitalares e a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias - EMBRAPA de Pelotas - Rio Grande do Sul - Brasil, por fornecer as bactérias fitopatogênicas ao Laboratório de Enobiotecnologia; ao Laboratório de Química Orgânica; ao Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul - Caxias do Sul - RS, pelo fornecimento da linhagem do fungo e pelas amostras de leveduras testadas e finalmente

à CAPES pelo apoio financeiro.

### Referências Bibliográficas

- AMES, B. N. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environm. Mol. Mut.*, 16: 66-77, 1989.
- BERNARDINI, M. *et al.* Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, 14: 1865, 1975.
- CIANCIO, A. Observations on the nematicidal properties of some mycotoxins. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 451-454, 1996.
- CRISAN, E. V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium anisopliae* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 260-264, 1971.
- DIENER, L. U.; DAVIS, N. D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: GOLDBLATT, L. A. *Aflatoxin*. New York: Academic

- Press, 1969. 472.p.
- DUMAS, C. *et al.* Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108: 195-203, 1995.
- GROVE, J. F.; POPLER, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia*, 70: 103-105, 1980.
- HAMILL, R. L. *et al.* The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters*, 49: 4255-4258, 1969.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D. L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environmental Entomology*, 5: 935-936, 1976.
- JEGOROV, A.; SEDMERA, P.; MATHA, V. Biosynthesis of destruxins. *Phytochemistry*, 33: 1403-1405, 1995.
- KAJIANG, L.; ROBERTS, D. W. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarrhizium anisopliae* var. major. *Journal Invertebrate Pathology*, 47(3): 120-122, 1986.
- KODAIRA, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Textile Science and Technology*, Shinshu-University, n° 29, Série E. *Agriculture and Sericulture*, 5: 1-68, 1961.
- KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substance to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 26: 36-42, 1962.
- KODAIRA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 25: 261-262, 1969.
- LOGRIECO, A. *et al.* Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia*, 122: 185-190, 1996.
- MOHAMED, A. K. A.; NELSON, F. R. S. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. *Journal of Agricultural Entomology*, 1: 349-353, 1984.
- MYKUMI, T.; KAWAKAMI, K. Toxinas produzidas por *Nomuraea rileyi*. In: BURGESS, H. D. *Microbial Control of Pests and Plant diseases. 1970-1980*. New York: Academic Press, 450-451, 1981
- MYOKEY, R. *et al.* Aspochracin, a new insecticidal metabolite of *Aspergillus ochraceus*. Part I. Isolation, structure and biological activities. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 33: 1491-1494, 1969.
- OVCHNNIKOV, Y. A. Membrane active complexones. Chemistry and biological function. *Febs Letters*. 44: 01-21, 1974.
- RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; MARACOS, C. M. Detection, identification, and surveillance of mycotoxins in cereals and other foods. *Fedrip database*, 3: 45-49, 1995.
- SEO, Y.; KIM, J.; KIM, B. Isolamento e identificação de substâncias de antifúngicas produzidas por sp. de *Fusarium* BYA-1. *Corean Plant Patology*. 12: 72-79, 1996.
- VANDERPITTE, J. *et al.* *Procedimentos laboratoriais em bacteriologia clínica*. Organização Mundial de Saúde. Genebra. São Paulo: Santos, 1994. p.87.
- WASTI, S. S.; HARTMANN, G. C. Host-parasite, Interactions between larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepdoptera: Lymantridae) and the entomogenous fungus, *Nomuraea relewi* (Farlow) SAMSON (Moniliales: moniliaceae). *Applied and Entomological Zoology*, 13(1): 23-28, 1978.
- WEST, E. J.; BUGGS, J. D. *In vitro* toxin product by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in cater wax larval. *Journal of Economic Entomology*, 61: 684-687, 1968.
- YE, M. Z. *et al.* Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Acta agriculturae Universitatis Zheijiangensis*, 19: 76-79, 1993.

Recebido em: 20/06/98

Aceito em: 02/02/99