

## Isolamento e caracterização de fungos endofíticos de Myristicaceae com potencial de atividade antioxidante

Fernandes KRP<sup>1</sup>, Bittencourt PST<sup>2</sup>; Teixeira AF<sup>1</sup>, Souza AQL<sup>2</sup>; Nunomura RCS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM, <sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM. E-mail: kamila.rangelprimo@gmail.com

### Resumo

A pesquisa dos fungos endofíticos, principalmente os presentes em espécies tropicais, é um campo promissor na descoberta de novos produtos fármacos. Não havendo estudos a respeito da microbiota endofítica de *Virola venosa* a pesquisa em questão contribuiu para a sociedade com novas informações a respeito desta espécie. Este trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial antioxidante de fungos endofíticos isolados de *Virola venosa* e dos extratos vegetais da hospedeira. Também foram realizados o isolamento e identificação de fungos endofíticos de várias partes de *V. venosa*. Nos ensaios de atividade antioxidante foram obtidos resultados representativos nos extratos brutos de caule e folha, utilizando o radical livre DPPH, sendo que o extrato bruto do caule apresentou IC<sub>50</sub> igual a 55,9 µg/mL, e no ensaio de fenólicos totais a amostra apresentou maior concentração de fenólicos (224,39 µg/mL) mostrando a relação existente entre esta classe de substâncias e a atividade antioxidante.

**Palavra chave:** fungos endofíticos, *Virola venosa*, atividade antioxidante

### Introdução

A Família *Myristicaceae* é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. Caracterizada, principalmente, por ser árvores medianas, e árvores de dossel. Constituída por cerca de 8 gêneros e 400 espécies, as *Myristicaceas* nas Américas são representadas por cinco gêneros endêmicos, com aproximadamente 93 espécies. *Virola* é um dos gêneros mais amplamente disperso (Rodrigues, 1980).

Acredita-se que a maioria dos metabólitos secundários cumpre função de defesa da planta contra predadores e patógenos, atuando como agentes alelopáticos, sendo que os metabólitos são liberados para exercer efeitos sobre outras plantas e de atrair os polinizadores.

Os metabólitos secundários considerados importantes para o ser humano são os terpenóides, alcalóides, compostos nitrogenados derivados dos fenilpropanóides e os

compostos fenólicos, considerando que estas classes funcionam como reguladores de rotas biossintéticas específicas e outras como reguladores pleitrópicos (Teixeira, 2007).

As plantas produzem substâncias de interesse econômico, provenientes de seu metabolismo, mas contêm também, fungos que produzem substâncias importantes, principalmente os decompositores dos componentes primários da madeira.

Pertencentes ao reino Fungi, os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos (Minami, 2003).

Dentre os fungos, são considerados endofíticos aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar mal ao hospedeiro, não desenvolvem estruturas externas, excluindo as bactérias nodulantes e fungos micorrízicos” e que podem ser cultiváveis ou não (Azevedo e Araújo, 2006).

### **Material e Método**

Diferentes partes do material vegetal (galhos, folhas e caule) de *V. venosa* foram coletadas na região urbana de Manaus no campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Foram obtidos extratos hexânicos, de acetato de etila e metanólicos através de extração a frio, e foram realizados o isolamento e caracterização de fungos endofíticos.

Após a desinfecção, o material vegetal foi inoculado em placas de petri, contendo meio de cultivo BDA. A partir da contagem das colônias purificadas foi obtida a diversidade de fungos, determinando-se, agrupamentos de acordo com suas características morfológicas.

A obtenção dos metabólitos ocorreu através da seleção de 20% dos morfotipos de cada grupo morfológico, do qual foram inoculados em meio líquido BDL, e em seguida foram incubados em shaker, com agitação 120 rpm por 15 dias em 28°C. Os sobrenadantes foram direcionados a extração em coluna SPE C<sub>18</sub>, e com o micélio foi realizada a extração com metanol após 72h (Souza *et al.*, 2004)

A atividade antioxidante dos extratos foram avaliados com base na captura de radicais livres de DPPH. Inicialmente 200 µL de uma solução metanólica de DPPH 100 mM foram misturadas com 20 µL de extrato (ou padrão). Após mistura, permaneceram durante 30 minutos encubados na ausência de luz (Moein *et al.*, 2007). O ensaio foi realizado em um leitor de microplacas ELX 800 no comprimento de onda de 490 nm.

O ensaio de fenólicos totais foi realizado adicionando 0,750 mL de solução folin ciacateau 2N (10x diluída) em 100 µL da amostra de extrato (1mg/mL) ou padrão, após 5 minutos encubados, 0,750 mL de bicarbonato de sódio 60g/L é adicionado a mistura, depois de 90 minutos de encubação a leitura foi realizada em espectrofotômetro de UV/Vis à 725 nm. A curva analítica foi obtida utilizando o ácido gálico nas concentrações de 0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0.03125 mg/mL. Os resultados foram expressos em µg/mL equivalentes de ácido gálico (Velioglo *et al.*, 1998).

## Resultados

Com a extração a frio, obteve-se o total de doze extratos vegetais brutos de galhos verdes e maduros, folhas e caule, em hexano, acetato de etila e metanol. Foram isolados 122 fungos endofíticos, porém apenas 105 foram agrupados e identificados morfológicamente, gerando 16 grupos distintos (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos dos prováveis gêneros de fungos

Grupos	Número de isolados	Características morfológicas	Provável gênero
G1	62	Característica de Ascomycetes	<i>Phomopsis</i>
G2	20	Característica de mitospóricos	<i>Colletotrichum</i>
G3	10	Coloração preta como de ascos	<i>Ascomycetes Preto</i>
G4	1	Coloração castanha, micélio rasteiro	
G5	1	Fungos mitospórico, coloração marrom	
G6	1	Característica de Ascomycetes	<i>Ascomiceto Estomático</i>
G7	1	Característica de Ascomycetes	
G8	1	Característica de Ascomycetes	<i>Xylaria</i>
G9	1	Coloração cinza, micélio cotonoso	
G10	1	Coloração esverdeada, Micélio cotonoso	
G11	1	Coloração branca	
G12	1	Característica de Ascomycetes de coloração branca	<i>Ascomycetes</i>
G13	1	Levedura de coloração bege	<i>Levedura</i>
G14	1	Levedura de coloração Rosa	<i>Levedura</i>
G15	1	Levedura de coloração cinza	<i>Levedura</i>
G16	1	Fungo colorido, Metabólito rosa	

Após a obtenção dos metabólitos e extração destes em fase reversa C<sub>18</sub> e do micélio em extração com metanol, e doze extratos vegetais brutos, totalizando sessenta e oito extratos, os quais foram submetidos ao teste de atividade antioxidante.

Através da AA%, pode-se perceber que para os sessenta e oito extratos testados, apenas três apresentaram uma relevante atividade antioxidante, sendo estes os extratos

vegetais brutos, de folhas em metanol, caule em metanol e em acetato de etila. Os valores do AA% destas amostras constam na Tabela 2. E os valores de IC<sub>50</sub> para os três selecionados e para o padrão, quercetina estão listados na Tabela 3.

A amostra do extrato bruto do caule em acetato de etila apresentou menor IC<sub>50</sub> seguido das folhas e caule em metanol sendo 55,9, 75,1 e 75,15(µg/mL) respectivamente. Quanto menor o IC<sub>50</sub> maior é o potencial antioxidante da amostra.

Tabela 2- Capacidade de captura de radicais livres (AA%) dos extratos vegetais brutos da *V.venosa*.

Atividade Antioxidante		
Amostra	Concentração	AA%
Caule MeOH	1mg/ml	84,2
	0,1mg/ml	72,1
	0,01mg/ml	32,0
Folhas MeOH	1mg/ml	87,1
	0,1mg/ml	50,4
	0,01mg/ml	30,5
Caule AcOEt	1mg/ml	88,22
	0,1mg/ml	53,1
	0,01mg/ml	30,3

Tabela 3- Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos brutos de *V. Venosa*

IC50	
Amostra	(µg/mL)
Quercetina	14,77
Caule (AcOEt)	55,9
Folhas (MeOH)	75,1
Caule (MeOH)	75,15

Apesar do resultado promissor, as amostras dos extratos brutos apresentaram potencial antioxidante quatro vezes menores que o padrão utilizado, quercetina (IC<sub>50</sub> = 14,77 µg/mL). Os extratos com potencial antioxidante também apresentaram uma

grande quantidade de fenólicos, principalmente, no extrato bruto de caule obtido em acetato de etila (224,39 µg/mL). Já nos extratos que não apresentaram atividade antioxidante no ensaio de DPPH não foram encontrados valores significativos equivalentes de ácido gálico, o que confirma a relação entre baixos valores de fenólicos totais e o baixo potencial antioxidante.

### **Discussão**

Os extratos de *V.venosa* é fonte de fungos endofíticos, essa espécie vegetal mostrou-se hospedeira de um número total considerável de endófitos, levando em consideração que muitas espécies de fungos não são cultiváveis e, portanto, o isolamento expressa a frequência de fungos endofíticos cultiváveis e não o total de fungos endofíticos presente na planta.

A ausência de microrganismos epifíticos ou contaminantes na contra prova de desinfecção superficial, corroboram com os resultados obtidos no isolamento. Sendo que o número significativo de endófitos encontrados em galhos, 50,82% pode estar relacionado tanto com o modo que o endofítico penetra na planta, por transmissão vertical ou horizontal, quanto com a existência de condições favoráveis à permanência ou crescimento do fungo em tecidos específicos.

É importante também lembrar que a etapa de desinfecção superficial deve ser específica para cada espécie vegetal e cada parte da planta, tendo em vista as diferenças entre os tecidos de cada planta. Vale ressaltar que a diversidade dos fungos identificados e seus prováveis gêneros, caracterizaram estes endófitos para com esta hospedeira.

Os resultados dos testes de atividade antioxidante mostraram que os extratos de micélio extração em metanol e dos sobrenadantes em extração com C<sub>18</sub>, não apresentaram nenhuma atividade significativa comparadas com o padrão, o que possivelmente que estes fungos não metabolizam substâncias com potencial antioxidante.

Enquanto que nos extratos que apresentaram atividade antioxidante pode-se observar a relação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos, a amostra do caule apresentou o maior IC<sub>50</sub> (µg/mL) e maior quantidade de fenólicos (µg/mL).

### **Conclusões**

Mediante aos resultados apresentados foi possível compreender que a espécie *Virola venosa* é uma ótima hospedeira de fungos endofíticos, apresentando ampla diversidade.

Com relação ao teste atividade antioxidantes no qual os extratos dos isolados fúngicos foram testados, estes demonstraram uma baixa capacidade de sequestrar radicais livres, ou seja, nenhum dos extratos se destacou em relação à presença de compostos com atividade antioxidante.

Visto que os extratos promissores de atividade antioxidantes foram os extratos os obtidos com solventes de alta e média polaridade que podem ter promovido a extração de compostos fenólicos, sendo assim podemos relacionar que a atividade antioxidante destes extratos está intimamente ligada aos compostos fenólicos contidos nestes extratos.

### Referências

Azevedo JL, Araujo WL (2006). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI BN DESMUCKH SK. Fungi. *Multifaceted Microbes*. New Dehli: Anamaya Publication, p.189-207.

Minami PS (2003) Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses. Barueri: Editora Manole, 199p.

Moein, S, Farzami B, Khaghani S, Moein MR (2007). Antioxidant properties and protective effect on cell cytotoxicity of *Salvia mirzayani*. *Pharm Biol*, 46:458–463,

Rodrigues WA 1980. Revisão Taxonômica das Espécies de *Virola* Aublet (*Myristicaceae*) do Brasil, *Acta Amazonica*, ano 10, n.1.

Souza AQL, Souza ADL (2004). O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aublet.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.

Teixeira AF (2007). Metabólitos secundários de frutos da *Virola molissima* (Poepp. ex. A. DC) Warb.: Neolignanas e Atividade Antifúngica. 2007. 156p. (Tese) Doutorado em química orgânica, USP. São Paulo.

Velioglo YS, Mazza G, Gao L (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food. Chem.*, 46:4113 - 4117.