

Avaliação da atividade anticandida de extratos de fungos do gênero *Pestalotiopsis* spp. isolados de ambientes amazônicos

Banhos E.F.¹, Souza A.Q.L.², Lima G.A.¹, Souza A.F.¹, Souza A.D.L.².

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte), Universidade Federal do Amazonas – UFAM. ² Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM

Emails: sandrobanhos@yahoo.com.br, antoniaqlsouza@gmail.com,
greiciane.andrade@yahoo.com.br, andreiaferreira2020@gmail.com, souzadq@gmail.com

Resumo

Os fungos do gênero *Pestalotiopsis* da ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae, demonstram potencial biotecnológico como fonte de recursos naturais na busca de fármacos. Esta pesquisa avaliou a atividade anticandida de *Pestalotiopsis* spp isolados da Amazônia. 24 linhagens foram cultivadas em Erlenmeyer (250mL), com 100mL de BDL, por 25 dias, 24°C. O meio fermentado extraído com AcOEt e o micélio com MeOH:AcOEt(1:1). Testados frente à *Candida albicans* (Fiocruz-CFAM-1342). Utilizou-se método de diluições em caldo, com NBT como revelador e Nistatina (2.0mg mL⁻¹) controle positivo. 11 demonstraram resultado positivo, seis do micélio e cinco de meio líquido. O meio líquido é geralmente a fonte mais rica de moléculas bioativas. Contudo, isolou-se substâncias bioativas do micélio, indicando que o extrato do micélio também deve ser investigado na busca de compostos bioativos desse gênero. As linhagens são promissoras a atividade anticandida, por apresentarem atividade em quase 23% dos extratos avaliados.

Palavras-chave: *Pestalotiopsis*, anticandida, extratos fúngicos, bioatividade.

Introdução

Na biotecnologia os fungos já são utilizados há séculos, desde a fermentação de bebidas alcoólicas no antigo Egito, como também servindo de alimentos desde a idade

média na Europa, passando pela fabricação de pães e queijos na atualidade, até a produção de compostos bioativos através de sua capacidade metabólica, como por exemplo, a produção de antibióticos como a penicilina e ácidos (Borzani *et al.*, 2001).

O gênero *Pestalotiopsis* pertence à ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae caracteriza-se pela presença de conidióforo dentro do corpo de frutificação denominado acérvulo. Os conídios apresentam cinco células, sendo três medianas de coloração marrom e duas células hialinas (apical e basal), com dois ou mais apêndices apicais. (Jeewon *et al.*, 2002).

No Brasil o gênero tem sido encontrado associado a espécies tropicais, este fato demonstra a capacidade de adaptação e a importância ecológica do gênero (Hanada *et al.*, 2010). Os endofíticos pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* tem demonstrado um grande potencial biotecnológico, sobretudo para a indústria farmacêutica, tanto da obtenção de compostos antimicrobianos, isolando antifúngico como o de *P. adusta*, quanto na obtenção de compostos com atividade citotóxica frente a células tumorais humanas, como isolados de *P. photiniae* (Che *et al.*, 2009).

Esse gênero tem sido isolado como endofítico de diversas plantas tropicais e tem sido utilizado também como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e aplicada (Hanada *et al.*, 2010; Strobel *et al.*, 1996). A diversidade de compostos isolados produzidos por fungos desse gênero demonstra como esse gênero é rico do ponto de vista de seu metabolismo secundário, o que o coloca como uma fonte de recursos naturais importantes para estudos relacionadas a busca de novos fármacos. Neste trabalho avaliou-se a atividade anticandida dos extratos obtidos de linhagens de *Pestalotiopsis* associadas a espécies vegetais Amazônicas.

Material e Métodos

Foram selecionadas 24 linhagens de *Pestalotiopsis* isoladas de espécies Amazônicas inoculadas em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis (Souza *et al.*, 2004).

Os frascos foram incubados por um total de 25 dias, sob temperatura de 24°C. Os parâmetros de tempo e temperatura de cultivo foram determinados pelas necessidades fisiológicas do gênero. Os constituintes fixos foram divididos em extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) para extração com solventes orgânicos

conforme descrito a seguir: AcOEt 100%, por 3 vezes, para o meio de líquido fermentado, e o micélio foi macerado em MeOH:AcOEt (1:1) por 48h e depois filtrado, por 3 vezes.

Todas as amostras foram secas em rotaevaporador e pesados. Todos os 48 extratos obtidos foram avaliados quanto a atividade anticandida, e para isso foi utilizada uma estirpe de *Candida albicans*, cedida pela coleção de microrganismos patogênicos da Fiocruz – AM código CFAM-1342, os testes foram determinados pelo método de diluições sucessivas em caldo, conforme recomendado pelo Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing do US National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997).

O bioensaio foi realizado em placas de 96 poços com 100µL de caldo saboraud dobrado, 100µL de solução dos extratos teste (2.0 mg.mL⁻¹), e 10 µL de suspensão fúngica com 1.0x10⁷ UFC.mL⁻¹, seguido por incubação a 37°C (24h) em triplicatas. Para solução dos extratos teste, estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 10% completado o volume final (90%) com água destilada autoclavada.

A bioatividade foi registrada como ausência de coloração nos poços depois da adição de 10µL de revelador azul de nitrotetrazólio (NBT). Nistatina (2,0mg.mL⁻¹) foi usado como controle positivo e cultivo em meio saboraud, sem aditivos, foi usado como controle negativo.

Resultados e Discussão

Dos 48 extratos brutos testados frente a *C. albicans* 11 demonstraram resultado positivo, desses, seis foram obtidos da maceração do micélio extraído com MeOH:AcOEt e cinco foram obtidos da extração líquido-líquido do meio líquido fermentado extraído com AcOEt. As linhagens de *Pestalotiopsis* que apresentaram resultado positivo foram codificadas como P10, P11, P12, P47, P46, P40, P31, P19, P23 e P33, sendo que a linhagem P10 apresentou resultado tanto no extrato obtido do meio líquido fermentado, quanto no extrato bruto obtido do micélio, completando os onze extratos brutos com resultado positivo.

O número de linhagens com resultado positivo demonstra o potencial desse gênero para obtenção de substâncias bioativas. Da mesma forma os resultados obtidos revelaram que linhagens de diferentes hospedeiros apresentaram atividade, o que indica que esse gênero possui uma versatilidade metabólica provavelmente promovida pela interrelação com seu hospedeiro, como o descrito em trabalhos como o de Strobel *et al.*, (1996).

De forma geral, os trabalhos com esse gênero têm demonstrado que uma boa seleção do hospedeiro para o isolamento de linhagens desse gênero é fundamental para a obtenção de linhagens com potencial biotecnológico (Strobel *et al.*, 1996).

Dentre os resultados obtidos também chama atenção o modo de cultivo, pois das dez linhagens que apresentaram resultado positivo frente a *C. albicans* oito foram cultivadas sob agitação (P10, P11, P12, P46, P31, P19, P23 e P31) e apenas duas em modo estático (P40 e P47). Essa informação demonstra que a aeração deve ser um fator a ser levado em consideração quando se busca compostos bioativos obtidos dessas linhagens.

Dentre as linhagens que apresentaram resultados positivos duas (P11 e P12) foram isoladas da casca do caule de *Rollinia sp*, um gênero de anonácea bem conhecida na região Amazônica. Outras duas linhagens (P19 e P47) foram isoladas das raízes da *Euterpe oleracea*, a espécie conhecida popularmente como açazeiro. Também apresentaram resultados positivos linhagens de *Pestalotiopsis* isoladas do caule de *Myrcia guianensis* (P23), uma Myrtaceae bem distribuída na região amazônica, conhecida popularmente como pedra-ume-caá ou vassourinha. Duas linhagens foram isoladas de Basidiomicetes (P31 e P33).

Os trabalhos de isolamento de compostos de *Pestalotiopsis*, nos diferentes meios de cultivo, tem mostrado que o meio líquido fermentado é a fonte mais rica de moléculas bioativas quando comparada com os extratos do micélio (Che *et al.*, 2009). Contudo em trabalho realizado por Wray *et al.*, (2011) foi possível o isolamento de Pestalotiopsonas, uma cromona presente no micélio de *Pestalotiopsis sp*, sendo que uma de suas isoformas mostrou citotoxicidade moderada, indicando que o extrato do micélio também deve ser investigado quando se busca compostos bioativos de fungos desse gênero.

Das espécies que apresentaram atividade biológica podemos destacar a espécie *P. microspora*, comumente descrita como endófito de uma variedade de espécies vegetais, tanto plantas de clima tropical quanto temperado, bastante versátil do ponto de vista metabólico, produzindo compostos bioativos como o taxol, ácido torreiânico, ácido ambuíco entre outros (Strobel, 1996, Lee *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001).

A linhagem P40 foi isolada das folhas de uma espécie de *Gustavia elliptica*, além e uma linhagem isolada dos espinhos de *Pinus elliottii* (P10). Das dez linhagens que apresentaram resultado positivo frente a *C. albicans* oito foram cultivadas sob agitação, em incubadora B.O.D. (P10, P11, P12, P46, P31, P19, P23 e P31) e apenas duas em modo estático (P40 e P47).

Podemos destacar também os resultados de P10, identificada por biologia molecular como *P. disseminata* (B5-3) que apresentou resultados positivos tanto nos extratos de seu meio líquido fermentado quanto de seu micélio. A capacidade metabólica de fungos dessa espécie já foi descrita anteriormente por Gloer *et al.*, (2006), no isolamento das 6-Hidroxipunctaporonina A e B, sesquiterpenos em que a forma B apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Conclusões

As linhagens testadas são promissoras a obtenção de compostos com atividade anticandida, por apresentarem atividade em quase 23% dos extratos.

A produção de compostos com atividade anticandida demonstrou depender da aeração para sua obtenção.

A maioria dos extratos com bioatividade foi obtida do meio líquido, o que demonstra que este é uma fonte mais rica dessas biomoléculas.

Através do trabalho foi possível selecionar 11 linhagens do gênero *Pestalotiopsis* para etapas subsequentes de investigação, sendo elas o isolamento e identificação de compostos com propriedade biativas.

Agradecimentos

Nosso agradecimento ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, que viabilizaram a realização desse trabalho.

Referências

Borzani W, Schmidell W; Lima UA; Aquarone E (2001) - Biotecnologia Industrial vol 1. Ed. Blucher.

Che Y, Ding G, Zheng Z, Liu S, Zhang H, Guo L (2009) Photinides A-F, Cytotoxic Benzofuranone-Derived γ -Lactones from the Plant endophytic Fungus *Pestalotiopsis photiniae*. *J Nat Prod* 72: 942-945.

Gloer JB, Deyrup ST, Swenson DC, Wicklow DT (2006) Caryophyllene Sesquiterpenoids from a Fungicolous Isolate of *Pestalotiopsis disseminata*. *J Nat Prod* 69: 608-611.

Hanada RE, Pomella AWW, Costa HS, Bezerra JL, Pereira JO (2010) Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of Black-pod disease. *Fungal Biol* 30: 1-10.

Jeewon R, Liew ECY, Hyde KD (2002) Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Mol Phylogen Evol* 25: 378–392.

Lee JC, Strobel GA, Lobkosky E, Clardy JC (1996) Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J Organ Chem* 61: 3232-3233.

Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, Strobel GA (2001) Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochem* 56(5): 463-468.

NCCLS (1997) Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, NCCLS Approved Standard M7-A4.

Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* 34(2):185-195.

Strobel GA, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM (1996) Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol* 142: 435–440.

Wray V, Xu J, Aly AH, Proksch P (2011) Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* Tetrah Letters 52: 21-25.