



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
PLANTAS DE ECOSISTEMAS DE
IPUCAS NO ESTADO DO TOCANTINS

LIA CARDOSO ROCHA SARAIVA TEIXEIRA

BELO HORIZONTE

2007
2007

Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas de ecossistemas de
Ipucas no estado do Tocantins

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre em Ciências
Biológicas
Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-orientador: Luiz Henrique Rosa - UFOP

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2007

Teixeira, Lia Cardoso Rocha Saraiva
Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de
plantas de ecossistemas de Ipucas no estado do Tocantins.
[manuscrito] / Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira. – 2007.
65 f. : Il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Augusto Rosa. Co-orientador: Luiz Henrique
Rosa .

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fungos endofíticos – Teses. 2. Produtos de ação
antimicrobiana - Teses. 3. Fungos – Teses. 4. Microbiologia – Teses.
I. Rosa, Carlos Augusto. II. Rosa, Luiz Henrique. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 582.28

Colaboradores

Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes¹

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta¹

Dr. Carlos Leomar Zani²

Dra. Rachel Basques Caligorne³

1. Laboratório de Microbiologia Ambiental – Universidade Federal do Tocantins
2. Laboratório de Química de Produtos Naturais – Centro de Pesquisa René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz
3. Laboratório de Pesquisas Clínicas – Centro de Pesquisa René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz

Á Vovó Annette, Mamãe, Papai, Júlia e
Bruno com todo meu amor e carinho.

“Eu escrevo sem esperança de que o que eu escrevo altere qualquer coisa. Não altera em nada... Porque no fundo a gente não está querendo alterar as coisas. A gente está querendo desabrochar de um modo ou de outro...”

Clarice Lispector

Agradecimentos

Ao meu orientador Carlos Rosa por ter possibilitado a realização deste trabalho. Agradeço muito por todo o aprendizado desses anos e principalmente pelo “turismo científico”, que tornou este trabalho ainda mais prazeroso.

Ao meu co-orientador Luiz Rosa, pelo apoio constante durante o desenvolvimento deste trabalho. Ajuda indispensável e empolgação contagiante ! Muito obrigada!

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, em especial à coordenadora Erna Kroon.

À Cristina e ao Douglas (e agora a Fatinha tb!), sempre dispostos a ajudar!

Ao Departamento de Microbiologia em nome da Prof. Maria Aparecida Rezende

Aos queridos colegas do laboratório de ecologia e Biotecnologia de Leveduras: Anne Carol, Bia Borelli, Carol Líliam, César, Cristina, Fabiana, Fátima, Fatinha, Ilanna, Inayara, Isabella, Maria nas, Polly, Raquel e Susanne. Agradeço pelo companheirismo, ajuda e torcida pelo sucesso deste trabalho. Um agradecimento especial à Adriana, Lú, Lud(myla), Michele e Renata queridas amigas!

À Natália, Mari, Gabriela, Vivian e Fernanda pela ajuda indispensável na execução deste trabalho. Um agradecimento mais que especial à querida amiga Aline, pelas discussões valiosas que certamente enriqueceram este trabalho.

Ao Carlos Zani por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos deste trabalho. Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisa René Rachou pela receptividade e colaboração.

À Rachel Caligiorne e Sabrina Campolina pela ajuda fundamental e indispensável no sequenciamento das amostras. Aos colegas do laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisa René Rachou pela receptividade e colaboração.

À Paula Moraes e Raphael Pimenta por todo o apoio durante as coletas realizadas.
Agradeço também aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFT pela receptividade e ajuda nesse período.

À minha Vó Annette por todo o incentivo e por sempre acreditar em mim!
Agradeço a toda a minha família, Vô, Tios e Primos, muito queridos!

À Mamis, Papai, Júlia e Bruno, família que eu amo e mesmo de longe estive 100% presente.

Às minhas queridas amigas e irmãs Aninha, Bia e Fernanda pelo incentivo, boas risadas, conselhos... enfim... por estarem sempre por perto. Amo vocês!!!

Aos amigos mais que especiais: Nara, Marah, Raoni, Cris, Rafa, Nando, Pedrinho, Lumbriga, Fé Caldas, Bê.

À FAPEMIG e CNPq pelo financiamento.

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho!

Conteúdo

Lista de Figuras...	2
Lista de tabelas ...	3
Resumo	4
Summary ...	6
1 – Relevância e Justificativa	7
2 – Revisão bibliográfica.....	9
2.1 – Fungos endofíticos	9
2.2 – Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos ...	12
2.2.1 – Substâncias antimicrobianas	15
2.3 – Ecossistemas de ipucas	17
3 – Objetivos.....	21
3.1 – Objetivo geral.....	21
3.2 – Objetivos específicos	21
4 – Material e Métodos	22
4.1 – Área de estudo	22
4.2 – Isolamento dos fungos endofíticos	22
4.3 – Cultivo dos fungos e preparo dos extratos.....	27
4.5 – Determinação da atividade antimicrobiana.....	27
4.6 – Identificação dos fungos endofíticos	28
5 – Resultados e discussão	31
5.1 – Isolamento e obtenção dos extratos.....	31
5.2 – Atividade antimicrobiana.....	31
5.3 – Identificação de isolados ativos	46
6 – Conclusões	51
7 – Bibliografia	52

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química das substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos .	13
Figura 2 – Vista externa de uma Ipuca.....	18
Figura 3 – Aspecto do interior de uma Ipuca	19
Figura 4 – Localização da área de estudo (Fonte – MARTINS, 2002)	23
Figura 5 – <i>Calophyllum brasiliense</i>	24
Figura 6 – <i>Sclerolobium</i> .sp.....	
Figura 7 – <i>Vochysia</i> sp.	25
Figura 8 – Número de extratos de fungos endofíticos ativos contra microrganismos alvos em relação ao meio de cultivo utilizado.	26
Figura 9 – Porcentagem de fungos ativos para cada meio de cultivo testado.	35
Figura 10 – Número de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana para um ou mais microrganismos alvos.	38
Figura 11 – Halos de inibição produzidos por três extratos de fungos endofíticos contra <i>C. sphaero spermum</i>	
Figura 12 – Halo de inibição produzido contra <i>Candida albicans</i> pelo extrato do fungo endofítico UFMGCB 763 crescido em ágar batata-sacarose (PDS).	42
Figura 13 – Fungos ativos e suas plantas hospedeiras.....	45
Figura 14 – Halo de inibição contra <i>Staphylococcus aureus</i> produzido pelo extrato do fungo endofítico <i>G. fugikuroi</i> UFMGCB 1416 crescido em ágar batata.(PDS).	48

Lista de tabelas

Tabela 1 – Número de indivíduos de três espécies de plantas amostradas e número de fungos endofíticos isolados.....	32
Tabela 2 – Medida dos halos de inibição em milímetros dos extratos de fungos endofíticos que apresentar atividade antimicrobiana em cada meio de cultura testado.....	39
Tabela 3 – Tabela 3 - Identificação dos fungos endofíticos pela análise da sequência da região transcrita interna (ITS) no "Genbank".	47

Resumo

Micror ganismos endo fítico s, aqueles que vivem no s tecidos de plantas vivas, são relativamente pouco estudados e são fontes potenciais de moléculas que podem ser utilizadas na medicina, agricultura e indústria. O objetivo desse trabalho foi detectar a presença de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por fungos endofíticos isolados de plantas presentes em fragmentos florestais naturais, “Ipucas”, no Cerrado do estado do Tocantins. Para isso foram coletadas amostras de folhas de *Calophyllum brasiliense*, *Vochysia sp.* e *Sclerolobium sp.*, presentes nas Ipucas, para o isolamento dos fungos. Os morfotipos isolados foram depositados na coleção de fungos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os fungos foram cultivados em microplacas de 24 poços e obtenção dos extratos foi realizada utilizando a extração com metanol. Para a detecção de atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em disco para os seguintes microrganismos alvos: *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 2159, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. Para o fungo *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 foi utilizada uma suspensão de esporos que foi borrifada em um papel filtro com os extratos previamente aplicados. Para a identificação dos isolados ativos foi realizado o seqüenciamento da região transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal nuclear. Foram coletadas amostras de folhas de 281 espécimes de plantas, e, a partir destas, foram isolados 121 fungos endofíticos. Destes fungos foram produzidos 436 extratos, dos quais 42 (9,06%) apresentaram atividade antimicrobiana para um ou mais microrganismos-alvos. Esses extratos correspondem a 33 isolados distintos de fungos, representando 27,27% do total de microrganismos testados. Dentre os extratos ativos, 19 (45%) apresentaram atividade contra *C. sphaerophorum*, 11 (26%) contra *C. albicans*, 10 (24%) contra *C. krusei* e apenas dois (5%) extratos foram ativos contra *S. aureus*. Nenhum extrato foi capaz de inibir *E. coli*. Seis isolados ativos foram identificados pelo seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal. As espécies encontradas foram *Giberella fugikuroi*, *Curvularia aff. sp.*, *C. eragrostides*, *Pseudallescheria boydii* e *Pseudocercospora aff. luzardii*. A análise dos resultados obtidos indica que os fungos

endofíticos das três plantas estudadas de Ipucas podem representar uma fonte potencial de substâncias bioativas com atividade antimicrobiana.

Summary

Endophytes are microorganisms that live inside plant tissues without causing symptoms of disease. They are relatively poorly studied as source of new bioactive molecules that could be used in medicine, agriculture and industry. The purpose of this work was to screen for antimicrobial activity the endophytic fungi isolated from plants found in natural forest fragments, ipucas, in the state of Tocantins, Brazil. Endophytic fungi were isolated from three plant species, *Calophyllum brasiliense*, *Vochysia* sp. and *Sclerolobium* sp. The fungal isolates were deposited at the culture collection of the Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Tissue plugs of the fungi were cultivated on the surfaces of agar-solid in 24-wells in microtiter plates, and the extraction was carried out using methanol. Extracts were tested for antimicrobial activity by agar diffusion method against the following microorganisms: *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 2159, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. For *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 was used a suspension of spores that was inoculated in a paper filter where the extracts were previously applied. Fungal molecular identification was based on internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Leaf samples of 281 individual plants were collected, and a total of 121 endophyte fungi were isolated from these plants. A total of 436 extracts were produced from which 42 (9.06%) presented antimicrobial activity for one or more microorganisms tested. These extracts corresponded to 33 distinct fungal isolates, representing 27.27% of the total isolated microorganisms. Amongst the active extracts, 19 (45%) were able to inhibit *C. sphaerophorum*, 11 (26%) *C. albicans*, 10 (24%) *C. krusei* and only two (5%) extracts were active for *S. aureus*. None of the extracts was capable to inhibit *E. coli*. Six isolates were identified by ITS sequencing. The species founded were *Giberella fugikuroi*, *Curvularia* aff. sp., *C. eragrostides*, *Pseudallescheria boydii* e *Pseudocercospora* aff. *luzardii*. The analysis of the results obtained in our work indicates that some endophytic fungi from the three plants occurring in ipucas could represent a potential source of bioactive compounds with antimicrobial activity.

1. Relevância e Justificativa

A busca por substâncias de interesse farmacológico e agro-químico é foco de estudo de diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo. A resistência bacteriana a fármacos, aparecimento de novas doenças virais, a alta incidência de câncer e o aumento de infecções por fungos e bactérias multiresistentes na população mundial apenas ressaltam a importância da realização de trabalhos de prospecção de novas substâncias bioativas.

Microrganismos endofíticos, aqueles que vivem nos tecidos de plantas vivas, são relativamente pouco estudados e são fontes potenciais de moléculas que podem ser utilizados na medicina, agricultura e indústria. Estima-se que existam cerca de 300 mil espécies de plantas na Terra e cada planta pode ser hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos. Como poucas plantas foram estudadas em relação aos seus endofíticos, a probabilidade de se encontrar novos microrganismos capazes de produzir substâncias bioativas de interesse para o homem é grande.

Diferentes estratégias são adotadas para a detecção e descoberta de organismos produtores de substâncias bioativas. Dentre elas, o estudo de ambientes com elevada riqueza de espécies e inexplorados são bastante promissoras em estudos de bioprospecção. O Cerrado representa um dos principais biomas brasileiros, com grande diversidade biológica. A flora do Cerrado é a mais rica entre as savanas do mundo, com mais de seis mil espécies de plantas. Além de várias espécies serem endêmicas no Cerrado, grande parte delas ocorrem apenas em determinadas localidades. Os microrganismos endofíticos desse bioma foram pouco estudados e podem ser fonte de novas moléculas bioativas.

Os produtos naturais podem ser utilizados diretamente como fármacos quando apresentam estruturas químicas complexas de difícil ou inviável produção por síntese química. Também podem ser modificados quimicamente para aumentar a atividade e seletividade. Mesmo sem qualquer atividade biológica aparente, os produtos naturais podem servir de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Desta forma, apesar dos avanços no planejamento de fármacos utilizando modelagem química, síntese e química combinatória, os produtos naturais são importantes modelos para estudos celulares e moleculares, e para o desenvolvimento de novas substâncias de interesse clínico.

Atualmente, diferentes espécies de fungos são estudadas como fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, citotóxica, imunomoduladoras, tripanossomicida, fitotóxicas, inseticidas, analgésicas, entre outras. Desta forma, a perda da biodiversidade causada pela crescente destruição dos ecossistemas naturais reforça a necessidade de estudos relacionados ao registro da riqueza de espécies de fungos endofíticos nos ambientes tropicais, a montagem de coleções de culturas e o estudo de seus metabólitos bioativos.

