

JONATHAN HENRIQUE CARVALHO MANHÃES

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Cochliobolus sativus* PARA A PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M277o
2015
Manhães, Jonathan Henrique Carvalho, 1990-
Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico
Cochliobolus sativus para a produção de compostos
antimicrobianos / Jonathan Henrique Carvalho Manhães. –
Viçosa, MG, 2015.
x, 31f. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. *Cochliobolus sativus*. 3.
Metabólitos secundários. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

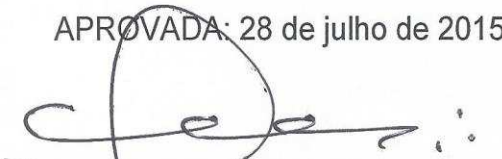
CDD 22. ed. 579.564

JONATHAN HENRIQUE CARVALHO MANHÃES


**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Cochliobolus sativus* PARA A PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2015


Eduardo Vinícius Vieira Varejão
(Co-orientador)


Sérgio Herminio Brommonschenkel


Maria Catarina Megumi Kasuya
(Presidente da banca)

*À minha mãe, Lourdes,
por lançar as bases
norteadoras que me
guiaram até aqui*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela oportunidade de trilhar os caminhos da vida sempre com um propósito e uma visão. Tudo é d'Ele e para Ele.

À minha mãe, Lourdes, por todo esforço, dedicação e amor incondicional, determinantes, para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Whelyton, Elyel, Quézia, Joelma e sobrinhos queridos, Ketilly, David, Adrielly, Caio, Arthur e à tia Iracema, que mesmo longe se mantiveram presentes, sempre me apoiaram e acreditaram nos meus propósitos para a vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelas portas abertas no campo da ciência e educação.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela orientação, confiança, ensinamentos e pelo exemplo.

Ao professor Eduardo Vinícius Vieira Varejão, pela co-orientação, paciência, apoio e incentivo.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelos conhecimentos passados ao longo desses dois anos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos pelo companheirismo, essenciais para transpor os desafios do dia-a-dia.

À Isabella Fernandes, Bruna Tolentino e Gabriela Maciel, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Aos colegas e amigos da pós-graduação. Em especial à Flávia Oliveira, Valquíria Campos, Vanessa Brito, Lina Cortez, Fernanda Souza, Laiane Marciel e Amanda Fernandes. Vocês foram fundamentais para esta conquista.

À amiga, de longa data e melhorista de plantas, Andréa Andrade, pela ajuda nas análises estatísticas dos dados, incentivo e todo apoio.

Aos muitos amigos, de perto e de longe, sempre presentes. Em especial à Mohammed Couto, Denis Harley, Ana Cecília, Lucas Correia, Thamar Holanda, Perla Oliveira, Rosana Guimarães, Edinilson Dias, Erick Máximo e Alex Crizanton.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo de Mestrado, Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

À todos que contribuíram de alguma forma para que este objetivo fosse alcançado.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

JONATHAN HENRIQUE CARVALHO MANHÃES, filho de José Manhães da Costa e Maria de Lourdes Fernandes Carvalho Manhães, nasceu em 14 de fevereiro de 1990, em Congonhas, no Estado de Minas Gerais.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista – Bahia, graduando-se como Bacharel em julho de 2013.

Em agosto de 2013, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	5
Resumo	9
Introdução.....	10
Material e métodos	12
Isolado endofítico	12
Cultivo do fungo e obtenção dos extratos.....	12
Ensaio Biológicos	13
Testes Antifúngicos	13
Testes antibacterianos.....	14
Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	15
Análise por Cromatografia Gasosa.....	15
Análise Estatística	16
Resultados.....	16
Discussão	19
Conclusões.....	22
Referências	23

RESUMO

MANHÃES, Jonathan Henrique Carvalho, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Cochliobolus sativus* para a produção de compostos antimicrobianos.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientador: Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

Os fungos endofíticos constituem um grupo de micro-organismos produtores de metabólitos secundários bioativos. Dentro desta perspectiva, foi estudado o potencial antimicrobiano do endofítico *Cochliobolus sativus*, isolado do feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris*. Foi investigada a capacidade deste fungo em produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica e antibacteriana em diferentes condições de crescimento, levando em consideração o meio de cultura, o fotoperíodo e o tempo de incubação. Os extratos gerados nas diferentes condições foram testados contra quatro fitopatógenos de importância agrícola e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse médico e industrial, utilizando o método de diluição em ágar e difusão em ágar, respectivamente. O extrato que apresentou os melhores resultados de inibição determinou a melhor condição de crescimento para a síntese desses compostos. Foi observado que a atividade do extrato E4 nos micro-organismos testados foi superior a atividade dos demais extratos, apresentando inibição significativa de 52%, 29,69% e 8,16% do crescimento micelial dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. A inibição do fitopatógeno *Colletotrichum lindemuntianum* não foi significativa. Quanto as bactérias, a atividade dos extratos brutos só foi observadas nas Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, apresentando os melhores halos de inibição, pelo extrato bruto 4, de 12 mm, 10 mm e 6,8 mm, respectivamente. A menor MIC (concentração mínima inibitória) do extrato bruto foi contra *S. aureus* (MIC = 32 µg mL⁻¹), enquanto em *B.*

subtillis e *E. faecalis* foi de 68 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo assim, foi selecionada a condição de crescimento correspondente ao extrato bruto E4 para otimização da síntese de metabólitos secundários em larga escala. Ensaio biológicos foram realizados, para averiguação da influência do pH do filtrado fúngico na extração com acetato de etila. Os resultados indicaram que não há necessidade de acidificação ou alcalinização do filtrado para se obter os compostos bioativos. Posteriormente, os extratos brutos foram submetidos a análises de cromatografia à gás, apontando inicialmente, para dois compostos majoritários. Procedimentos futuros serão empregados para o isolamento e caracterização completa desses compostos e será testada a capacidade do fungo para inibir o crescimento de fitopatógenos *in vivo*.

ABSTRACT

MANHÃES, Jonathan Henrique Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Optimization of culture conditions the fungus *Cochliobolus sativus* endophytic for the production of antimicrobial compounds.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Endophytic fungi constitutes a group of microorganisms capable of producing bioactive secondary metabolites. From this perspective, we investigated the potential antimicrobial activity of *Cochliobolus sativus* endophyte, isolated from the common bean *Phaseolus vulgaris*. We investigated the ability of this fungus to produce antifungal and antibacterial secondary metabolites in different growth conditions, taking into account the culture medium, photoperiod and incubation time. Extracts of the culture media generated under the various growth conditions were tested against four phytopathogenic fungi of agricultural importance and against gram-positive and gram-negative bacteria of medical and industrial interest, using the agar dilution method and agar diffusion, respectively. The extract that showed the best inhibition results determined the best growth condition for the synthesis of these compounds. Extract E4 showed the higher antifungal and antibacterial activities inhibiting 52%, 29.69%, and 8.16% of the mycelial growth of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, respectively. Also, this extract presented significant activity against gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Enterococcus faecalis*, producing inhibition zones of 12 mm, 10 mm, and 6.8 mm in diameter, respectively. MIC (minimum inhibitory concentration) values were determined as 32 ug mL⁻¹ for *S. aureus* and 68 ug mL⁻¹ for *B. subtilis* and *E. faecalis*. Therefore, the growth conditions that lead to extract E4 were selected for large scale fermentation and isolation of bioactive metabolites. Biological assays were performed to investigate

the influence of the pH of the culture filtrates on the of extraction of the metabolites. The results indicated that there is no need for acidification or alkalinization of the filtrate to improve the extraction of the bioactive compounds. Subsequently, the crude extracts were subjected to analysis by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry, pointing initially to two major compounds. Future procedures will be applied to the complete isolation and characterization of these compounds, which will be tested for its ability to inhibit *in vivo* growth of pathogens.

INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos anos a definição para micro-organismos endofíticos sofreu várias modificações. Em 1866, De Bary, introduziu o termo aplicando-o a todo micro-organismo que estivesse presente internamente nos tecidos das plantas, sendo essa definição usada com o objetivo de distingui-los dos fitopatógenos. Todavia, estudos detalhados mostraram que existem fitopatógenos capazes de viverem na sua forma latente no interior dos tecidos de seus hospedeiros. Deste modo, Petrini (1991) aperfeiçoou o conceito, definindo fungos endofíticos como aqueles micro-organismos que habitam o tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, podendo colonizar o interior da planta, mas sem causar doença no hospedeiro.

Os fungos endofíticos podem habitar folhas, pecíolos, estruturas reprodutivas, galhos, cascas e raízes de plantas (Rodriguez *et al.*, 2009), e ao longo dos anos, inúmeros grupos de pesquisa tem isolado e identificado um grande número de fungos endofíticos em diferentes espécies vegetais, desde árvores até plantas de pequeno porte. Tem sido demonstrado a presença desses micro-organismos em plantas medicinais (Garcia *et al.*, 2012; Alurappa *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015), espécies florestais (Campos *et al.*, 2015), gramíneas (Renkha & Shivana, 2014) e culturas de interesse agrônômico como o feijoeiro (Gonzaga *et al.*, 2014), a cana-de-açúcar (Leme *et al.*, 2013) e a soja (Leite *et al.*, 2013).

Estudos apontam que endofíticos vivem em associação simbiótica mutualista em todas as espécies vegetais do planeta, isto é, nenhum trabalho conseguiu demonstrar a ausência dos endofíticos em alguma planta (Kisa, 2015), e demonstrado a grande diversidade desses micro-organismos nas mais diversas plantas (Casella *et al.*, 2013).

Micro-organismos endofíticos formam uma relação simbiótica com sua planta hospedeira. Acredita-se que, em algumas situações, eles funcionam como agentes de defesa biológica da planta contra

fitopatógenos invasores. O mecanismo de proteção pelos micro-organismos endofíticos é exercido diretamente, pela liberação de compostos para inibir fitopatógenos ou lisar suas células e, indiretamente, por qualquer indução de mecanismos de defesa do hospedeiro ou promoção do crescimento (Alvin *et al.*, 2014). Antibióticos e enzimas hidrolíticas liberadas pelos endofíticos podem inibir a colonização dos tecidos vegetais pelos fitopatógenos ou o ataque de insetos e nematóides que infectam as plantas.

Além disso, estudos apontam a síntese de promotores de crescimento *in vitro* e *in vivo*. Khan *et al.* (2013) demonstraram o potencial dos fungos endofíticos para a produção de giberelinas e como indutores de resistência a estresses abióticos. Giberelinas são fitohormônios envolvidos várias funções metabólicas requeridas para o crescimento de uma planta, como a germinação de sementes, alongamento de ramos, florescimento, formação do fruto e senescência (Khan *et al.*, 2013).

Nos últimos anos tem se intensificado as investigações do potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos. Isto devido a confirmação que esses micro-organismos produzem inúmeras moléculas, produtos do seu metabolismo secundário, com atividades biológicas diversas (Hussain *et al.*, 2014a).

Sendo assim, tem sido isolado e caracterizado muitos metabólitos secundários que possuem atividade inseticida (Kusari; Pandey & Spitetter, 2013), nematicida (Campos *et al.*, 2008), antibacteriana (Li *et al.*, 2014), anticancerígena (Casella *et al.*, 2013; Hussain *et al.*, 2014; Kussai *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015), imunossupressora (Fu *et al.*, 2014), antioxidante (Alurappa *et al.*, 2014, Morais *et al.*, 2014) e herbicida (Hussain *et al.*, 2014b).

Esses produtos naturais com atividade biológica são originados de diferentes vias Biosintéticas do fungo endofítico e pertencem a inúmeros grupos estruturais como isocumarinas, fenóis, esteróides, terpenóides, xantonas, quinonas, benzopironas, tetralonas, citoclasinas e eniatinas (Yu *et al.*, 2010; Kaul, 2012).

Exemplos de metabólitos secundários incluem as penicilinas e cefalosporinas (Hussain *et al.*, 2014b). A Penicilina foi descoberta por Fleming em 1928 e foi originariamente isolada do fungo *Penicillium notatum*, sendo considerado um antibiótico de extrema importância na história da humanidade. A Penicilina G foi inicialmente utilizada durante a segunda guerra para tratar os soldados com infecções nos campos de batalha (Neff, 2011).

Desde então, a busca por novos antimicrobianos tem sido intensa e os micro-organismos endofíticos são considerados produtores potenciais destes compostos. Hussain *et al.* (2014b) isolaram citocalasinas E e K, a partir do fungo endofítico *Phyalospora* sp., que apresentaram forte atividade antifúngica, bem como atividade herbicida. Citocalasinas são um grupo de metabólitos fúngicos com estrutura molecular complexa e diversificada e que possuem várias atividades biológicas. Chen *et al.* (2015) isolaram duas novas citocalasinas do fungo endofítico *Phoma mulrostrata*. A indústria farmacêutica possui um grande interesse para por esse grupo de moléculas, uma vez que estas possuem atividades biológicas distintas como anti-HIV, inibidoras de proteínas kinases e tem função imunossupressora.

O rápido desenvolvimento em biologia molecular e genômica no passado recente oferece uma série de possibilidades de desvendar as várias facetas da ecologia e filogenia dos endófitos horizontalmente transmissíveis. Visualizando endófitos não apenas como um subconjunto de fungos, mas como parte integrante da comunidade vegetal, e estudar os diferentes aspectos de sua biologia irá nos ajudar a compreender a evolução da endofitismo entre fungos. As informações obtidas por esses estudos básicos precisam percorrer um longo caminho para que os melhores endófitos sejam utilizados em aplicações tecnológicas (Suryanarayanan, 2013).

Certamente a descoberta de novas substâncias é vantajosa, sendo uma área estimulante e bastante promissora. Sendo assim, estudos visando o isolamento e a identificação dos endofíticos, bem como o

isolamento e a caracterização dos metabólitos secundários são de fundamental importância para a descoberta de novos compostos, possibilitando uma ampla exploração do potencial biotecnológico desses micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- Alurappa R, Bojegovda MRM, Kumar V, Mallesh NK, Chowdappa S (2014). Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. *Natural Product Research* 28(23):2217-2220.
- Alvin A, Miller KI, Neilan BA (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research* 169:483-495.
- Campos FF, Rosa LH, Cota BB, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves, TMA, Rosa CA, Zani CL (2008). Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2:1-12.
- Campos FF, Sales Júnior PA, Romanha AJ, Araújo MSS, Siqueira EP, Resende JMR, Alves TMA, Martins-Filho AO, Santos VL, Rosa CA, Zani CL, Costa BB (2015). Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as atryanocidal metabolite from *Fusarium* sp. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110:65-74.
- Casella TM, Eparvier V, Mandavid H, Bendelac A, Odonne G, Dayan, L, Duplais C, Espindola LS, Stien D (2013). Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry* 96:370-377.
- Chen Z, Chen HP, Li Y, Feng T, Liu JK (2015). Cytochalasins from cultures of endophytic fungus *Phoma multirostrata* EA-12. *The Journal of Antibiotics* 68:23-16.
- Ferreira MC, Vieira MLA, Zani CZ, Alves TMA, Sales Junior PA, Murta SMF, Romanha AJ, Gil LHVG, Carvalho AGO, Zilli JE, Vital MJS, Rosa CA, Rosa LH (2015). Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 59:36-44.
- Fu Y, Wu P, Xue J, Wei X (2014). Cytotoxic and antibacterial quinone sesquiterpenes from a *Myrothecium* fungus. *Journal of Natural Products* 77:1791-1799.
- Garcia A, Rhoden SA, Bernadi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA (2012). Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic

fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2(10):35-40.

Gonzaga LL, Costa LEO, Santos TT, Araújo EF, Queiroz MV (2014). Fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* endophytic community and have high genetic diversity, as determined by IRAP and REMAP markers. *Journal of Applied Microbiology* 118:485—496.

Hussain H, Kliche-Spoy C, Al-Harrasi A, Al-Rawaki A, Abbas G, Freen IR, Schulz B, Krohn K (2014a). Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5224-5227.

Hussain H, Kock I, Al-Hassasi A, Al-Rawaki A, Abbas G, Green IR, Shah A, Badshah A, Saleem M, Draeger S, Schulz B, Krohn K (2014b). Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp.. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 699-702.

Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews* 11:487-505.

Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee IJ (2013). Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical Reviews of Biotechnology* 1-13.

Kisa H, Kamili AN, Nawchoo AI, Shafi S, Shammeeem N, Bandh SA (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis* 82:50-59.

Kusari S, Lamshoft M, Kusari P, Gottfried S, Zuhlke S, Louven K, Hentschel OK, Spiteller M (2014). Endophytes are hidden producers of maytansine in *Putterlickia* Roots. *Journal of Natural Products* 77:2577-2584.

Kusari S, Pandey SP, Spiteller M (2013). Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry* 91:81-87.

Leite, TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araújo EF, Queiroz MV (2013). Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *Journal of Microbiology* 51(1):56–69.

Leme AC, Bevilaqua MRR, Rhoden SA, Mangolin CA, Machado MFPS, Pamphile JA (2013). Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. *Genetics and Molecular Research* 2(3):4095–4105.

Li G, Kusari S, Lamsh OFT, Schuffler A, Laatsch H, Spiteller M (2014). Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41. *Journal of Natural Products* 77:2335–2341.

Morais MI, Pinto MEA, Araújo SG, Castro AHC, Duarte-Almeida JM, Rosa LH, Rosa CA, Johann S, Lima LARS (2014). Antioxidant and antifungal activities of *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). *Natural Product Research* 1-7.

Neff SA (2011). Chemical investigations of secondary metabolites from selected fungi and from peanut seeds challenged by *Aspergillus caelatus*. Ph. D Thesis. The University of Iowa.

Petrini O (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS. (eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, pp 179-197.

Renka D, Shivana MB (2014). Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of fungal endophytes in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. And *Dactyloctenium aegyptium* (L.) P. Beauv. *International Journal of Current Microbiology Applied of Science* 3(8):573-591.

Rodriguez RJ, White Junior JF, Arnold AE, Redman RS (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* 182(2):314–330.

Suryanarayanan TS (2013). Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology* 6:561-568.

Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P, Qin L (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 165:437—449.

COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS PELO FUNGO
ENDOFÍTICO *Cochliobolus sativus* ISOLADO DO FEIJOEIRO COMUM

COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS PELO FUNGO
ENDOFÍTICO *Cochliobolus sativus* ISOLADO DO FEIJOEIRO COMUM

Resumo

Este trabalho teve por objetivo investigar a otimização das condições de cultivo para a produção *in vitro* de metabólitos antimicrobianos pelo fungo endofítico *Cochliobolus sativus*, isolado do feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris*. Inicialmente, diferentes condições de crescimento foram avaliadas quanto à influência na produção de metabólitos pelo fungo. Os filtrados de cultura obtidos foram submetidos a extração em acetato de etila e as atividades antifúngicas e antibacterianas dos extratos foram avaliadas por meio dos métodos de diluição e de difusão em ágar, respectivamente. Os melhores resultados da atividade do extrato foi a inibição do crescimento micelial dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente e, das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Entre as condições avaliadas, o cultivo em caldo batata dextrose a 150 rpm, 25° C, sob fotoperíodo de 12/12 h por 10 dias forneceu extratos com as maiores atividades biológicas. Estas condições foram então empregadas para cultivo massal do fungo. Os filtrados de cultura tiveram seu pH ajustado a diferentes valores de modo a investigar a influência da acidez do meio na eficiência de extração desses compostos. Os diferentes extratos foram avaliados quanto às atividades biológicas e submetidos a análises preliminares por CG-EM. A menor MIC do extrato bruto foi contra *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez o potencial de um fungo endofítico do feijoeiro para a produção de compostos de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Antimicrobianos, Endofíticos, *Cochliobolus sativus*

Introdução

O fungo *Cochliobolus sativus* foi descrito pela primeira vez em 1935 por Dreschsler como um teleomorfo de *Bipolaris sorokinona*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Loculoascomycetes, ordem Pleosporales, e família Pleosporaceae (Noyd, 2000) e, tem sido isolado e caracterizado em diferentes trabalhos como um fungo endofítico (Campos *et al.*, 2008; Gonzaga *et al.*, 2014; Rekha e Shivana, 2014).

Micro-organismos endofíticos isolados de plantas tem sido fonte promissora de metabólitos secundários bioativos e quimicamente novos, para aplicação em diferentes áreas, como na indústria farmacêutica, no controle de fitopatógenos e de patógenos alimentares, dentre outras (Hussain *et al.*, 2014). Esses compostos tem demonstrado diferentes funções, como antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, biosurfactante e imunossupressora (Rönsberg *et al.*, 2013; Hussain *et al.*, 2014). Deste modo, o isolamento, a identificação e investigação do potencial biotecnológico de novos compostos produzidos por esses micro-organismos se torna necessário.

Espécies fúngicas tem se revelado como a principal fonte dessas moléculas e o gênero *Cochliobolus* sp., tem sido estudado dentro dessa perspectiva (Garcia *et al.*, 2012). Entretanto, apesar da existência de trabalhos demonstrando a aplicabilidade de seus metabólitos secundários, esse gênero ainda é pouco estudado.

Fungos endofíticos do gênero *Cochliobolus* tem sido isolados (Wężowicz; Rozpądek e Turnau, 2014) e compostos da classe das quinonas tem sido mais comumente encontrados nesse gênero (Alurappa *et al.*, 2014). Campos *et al.* (2008) isolaram e identificaram o composto Cochlioquinona A e Cochlioquinona B com propriedades nematicidas. Renkha e Shivana (2014) demonstraram o potencial antimicrobiano e antioxidante de compostos produzidos por endofíticos desse gênero.

Gonzaga *et al.* (2014) isolaram e identificaram fungos endofíticos de folhas de plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertencentes

a duas variedades (Ouro Negro e Talismã). Entre os isolados mais comumente encontrados na variedade Ouro Negro estavam fungos pertencentes ao gênero *Cochliobolus*, principalmente a espécie *C. sativus*. Santos (2014) analisou estes fungos endofíticos quanto a capacidade de inibição de fungos fitopatogênicos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os fungos endofíticos pertencentes a espécie *C. sativus* foram classificados entre os mais eficientes inibidores dos micro-organismos testados.

Neste trabalho foram determinadas as melhores condições de cultivo do fungo endofítico *C. sativus*, isolado do feijoeiro comum, para uma maior produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Além disso, foram realizados estudos preliminares com o objetivo de isolar e identificar novos compostos.

Material e métodos

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia, e no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Isolado endofítico

O fungo endofítico, *C. sativus* (Isolado CMON 25) utilizado neste trabalho foi isolado da cultivar Ouro Negro do feijoeiro comum (Gonzaga *et al.*, 2014) pertencente a Micoteca do laboratório de Genética Molecular de Micro-Organismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

Cultivo do fungo e obtenção dos extratos

O ensaio de fermentação em pequena escala foi realizado para otimizar as condições de produção de compostos. Os tratamentos foram combinações de diferentes meios de cultura líquido (Batata Dextrose-Himedia[®], Meio Mínimo, Czapek-dóx), fotoperíodo (12h e 0h) e tempo de incubação (10 e 20 dias), totalizando 12 tratamentos em triplicata, mais os controles com os meios não inoculados.

O inóculo do isolado endofítico foi crescido em meio BDA à 25° C e fotoperíodo de 12 h por 7 dias e, posteriormente, discos de 5 mm desse micélio fresco foram transferidos, assepticamente, para elernmeyers contendo 50 mL dos diferentes meios e cultivados sob agitação de 150 rpm à 25°C. As culturas em meio líquido foram filtradas em membrana de nylon e em papel de filtro para remoção de micélio e esporos. Os extratos foram separados do meio de cultura (100 mL) com acetato de etila (300 mL), previamente destilado, por três vezes. Os extratos foram secos sob sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados em evaporador rotatório IKA[®]

RV10. Os extratos sólidos assim obtidos foram utilizados para o preparo de soluções em diferentes concentrações para a realização dos ensaios biológicos.

A condição de cultivo cujo extrato orgânico apresentou as maiores atividades antifúngicas e antibacterianas foi utilizada para produção massal do fungo. Após crescimento, o meio de cultura foi submetido a filtração obtendo-se 2 L de filtrado de cultura. O valor de pH do filtrado de cultura foi determinado (pH 4,5) e três alíquotas (100 mL cada) foram utilizadas para avaliação da influência do pH na eficiência de extração dos metabólitos de interesse (Varejão *et al.*, 2013). A primeira alíquota teve o seu pH mantido a 4,5, a segunda teve o pH ajustado a 3,5 e a terceira alíquota a 8,5, utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio a 1 mol L⁻¹. Os extratos obtidos a partir de cada alíquota foram então avaliados quanto às atividades antifúngica e antibacteriana e submetidos a análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

Ensaio Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados visando a avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* raça 89, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e a avaliação da atividade antibacteriana nas capas de referências *Bacillus subtilis* ATCC 23857, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25238, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Escherichia coli* ATCC 29214 e *Enterococcus faecalis*.

Testes Antifúngicos

A atividade antifúngica dos extratos brutos foi avaliada pelo método de diluição em ágar, conforme Chutia *et al.* (2009). Os extratos foram adicionados ao meio BDA fundido (com 0,02% (v/v) de Tween 80), de modo que a concentração final do extrato foi de 100 µl mL⁻¹ e transferidos para

placas de Petri de 90 mm. Um disco de micélio fresco (5mm) dos fitopatógenos foi adicionado no centro de cada placa com o extrato diluído no meio já solidificado, e foi incubado na temperatura ideal para o crescimento do fitopatógeno em avaliação. Meio de cultura BDA sem o extrato foi utilizado como o controle negativo. O diâmetro do micélio de cada fitopatógeno foi mensurado, em quatro direções diferentes, a cada 24 horas até o momento em que os fitopatógenos inoculados nos controles negativos atingisse o seu crescimento máximo. A inibição do crescimento foi calculada pela fórmula: $\text{Inibição \%} = (D_c - D_t / D_c) \times 100$, onde D_c , corresponde ao diâmetro médio do micélio vegetativo das três replicatas do controle negativo e D_t = Diâmetro médio dos micélios do tratamento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC).

Testes antibacterianos

Para verificar a atividade antibacteriana dos extratos brutos foi utilizado o método de difusão em ágar. Os inóculos das cepas de referência foram preparados de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute*, CLSI (2012). Sendo assim, as bactérias foram crescidas em caldo Luria Bertani (Himedia® LB), *overnight*, e a suspensão de micro-organismo ajustada pela escala de turbidez 0,5 de McFarland, o que corresponde à uma densidade populacional de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Essa suspensão, foi diluída em LB na proporção 1:50 para a obtenção de um inóculo com aproximadamente 3×10^6 UFC mL⁻¹. Uma alíquota de 1 mL dessa diluição foi plaqueada por *pour-plate* em meio de cultura Ágar Muller-Hinton (Himedia®) em placas de petri de 90mm. Após a solidificação do meio, foram removidos três discos de 3 mm de diâmetro. Nestes locais foram alíquotados 10 µl de extrato bruto, ressuspensos em DMSO (Dimetil Sulfóxido) de qualidade analítica, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Posteriormente, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas e, incubadas em estufa bacteriológica à 37°C por 24 h. Após

esse período, halos de inibição, quando presentes, foram mensurados por meio de um paquímetro. O DMSO foi utilizado como controle negativo e todos os ensaios foram realizados em triplicata, no delineamento experimental inteiramente casualizado.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória dos extratos brutos contra as cepas bacterianas foi determinada pelo método padronizado de microdiluição em caldo, conforme as recomendações do CLSI (2012). Foram utilizadas placas de microcultivo onde 50 µL de meio Mueller Hinton foi adicionado aos 96 poços. Diluições seriadas foram realizadas com o extrato bruto de modo a obter as concentrações finais nos poços das microplacas (4 – 1024 µg mL⁻¹) e alíquotados nos poços contendo o meio de cultivo e o inóculo com bactéria em fase logarítmica de crescimento (Já ajustado na concentração 10⁶ UFC mL⁻¹).

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 37° C por 24 h e a absorbância a 620 nm mensurada por um leitor de microplacas antes e após a incubação. Em seguida, o método de resazurina (Bénére et al., 2007) permitiu confirmar os resultados espectrométricos visualmente, uma vez que é possível observar a presença de crescimento bacteriano pela mudança da coloração do corante pela redução do mesmo por células vivas. Cloranfenicol foi usado como controle positivo e o controle negativo foi evidenciado pelo meio de cultura sem inóculo e meio de cultura com DMSO.

Análise por Cromatografia Gasosa

Os extratos em acetato de etila foram analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, utilizando equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A, nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, *m/z* 30,00 a 700,00; coluna capilar RTx5 (30 m x 0,25 mm, 0,25µm); fluxo do gás de arraste (He)

1 mL min⁻¹; razão de split 1:5. Programação de temperatura, T₁= 40 °C por 5 min., gradiente de 4 °C min⁻¹ até T₂= 80 °C, gradiente de 10 °C min⁻¹ até T₃= 285 °C; temperatura do injetor 290 °C; temperatura do detector 290 °C.

Análise Estatística

Os dados dos ensaios antimicrobianos foram submetidos à análise confirmatória, procedendo-se os testes de normalidade, Shapiro e Wilk, utilizando os PROC's UNIVARIATY e TRANSREG. Posteriormente, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e a comparação de média pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, no software SAS versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2011).

Resultados

Para otimização da produção de metabólitos secundários, o fungo endofítico *C. sativus* foi crescido em diferentes condições de cultivo levando em consideração três diferentes fatores: meio de cultura (Batata Dextrose, Meio mínimo e Czapek-dóx), fotoperíodo (com e sem fotoperíodo) e tempo de incubação. As combinações desses fatores originaram 12 diferentes condições de crescimento para produção de extratos brutos que foram avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos e bactérias de interesse médico e industrial.

Sendo assim, para avaliar a atividade desses extratos, utilizou-se o método de diluição em ágar na investigação da atividade antifúngica e o método difusão em ágar para investigar a atividade antibacteriana. As tabelas 1 e 2 demonstram a atividade dos extratos brutos contra quatro fungos de interesse agrícola e contra seis bactérias, respectivamente. Observa-se que cada extrato bruto, codificados de E1 à E12, corresponde a uma condição de obtenção de metabólitos secundários diferente.

Nota-se que os 12 extratos se comportaram de forma diferente quando testados contra os quatro fitopatógenos e contra as bactérias. Deste modo, podemos afirmar que houve uma relação entre a condição de

crescimento do fungo endofítico e a produção de metabólitos secundários bioativos, bem como uma relação destes com os micro-organismos testados.

No que se refere à avaliação da atividade antifúngica, a inibição leva em consideração o crescimento micélio dos tratamentos, isto é, do meio com os extratos, em função do crescimento micélio dos controles negativos. Deste modo, quanto menor o crescimento micélio em relação ao controle, maior é a inibição. Percebe-se que o extrato E4 apresentou um maior potencial inibitório nos fungos testados. Podem ser observadas inibições de 52 % e 26,69 % do micélio dos fungos *S. sclerotiorum* e *R. solani*, respectivamente (Figura 1) e, 8,16% contra o fungo *F. oxysporum*. Contudo, o extrato E4 não apresentou potencial inibitório contra *C. lindemuthianum*.

A atividade antibacteriana foi determinada pela mensuração, quando presente, de halo de inibição na placa contendo a cepa de referência. Na tabela 2, observa-se que os extratos brutos foram ativos contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 23857 e *E. faecalis*. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* ATCC 25238, *P. vulgaris* ATCC 13315 e *E. coli* ATCC 29214 não foram inibidas por qualquer dos extratos brutos.

Semelhante aos testes antifúngicos, o extrato E4 obteve maior poder inibitório contra as bactérias Gram-positivas, demonstrando halos de inibição de 12,3 mm, 10 mm e 6,8 mm para *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, respectivamente.

Todos os filtrados das culturas crescidas em cada uma das condições de cultivo foram submetidos, rigorosamente, aos mesmos procedimentos de extração. Os extratos sólidos, obtidos após remoção do solvente extrator, foram testados nas mesmas concentrações. Desta forma, os resultados dos ensaios biológicos mostram que, entre as condições de crescimento utilizadas, o cultivo do fungo em meio BD, sob fotoperíodo de 12 h, com o endofítico inoculado por 10 dias foi a que proporcionou maior produção de metabólitos antimicrobianos,

O extrato em acetato de etila do filtrado obtido a partir dessa condição de crescimento foi submetido a ensaios para determinação da MIC pelo método de microdiluição (Tabela 3). A menor MIC do extrato bruto foi contra *S. aureus* ATCC 6538 (MIC = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto em *B. subtilis* ATCC ATCC 23857 e *E. faecalis* foi de 68 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Após a determinação das condições de crescimento que levaram à obtenção de extratos com melhores atividades antimicrobianas, o fungo foi cultivado em maior escala nessas mesmas condições para fins de investigação da constituição química do filtrado de cultura. Alíquotas dos extratos tiveram seu pH ajustado a diferentes valores e foram extraídas com acetato de etila. Os extratos obtidos foram então submetidos a avaliação das atividades antibacterianas, que mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre as atividades dos extratos obtidos a partir dos filtrados a diferentes valores de pH (resultado não mostrado). Esses dados indicam não haver influência do pH sobre a eficiência de extração dos compostos de interesse.

Os extratos foram também submetidos a análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. O filtrado do meio de cultivo não inoculado foi também extraído e analisado utilizando-se aos mesmos procedimentos para fins de comparação do perfil de metabólitos presentes em cada extrato. Os cromatogramas obtidos para cada um desses extratos obtidos partir dos filtrados em diferentes valores de pH (Figura 2 B, C e D) mostram uma série de picos com tempos de retenção (Tr) entre 55 e 65 minutos, que não estão presentes no cromatograma do extrato do meio não inoculado (Figura 2A). Esta comparação mostra que os compostos correspondentes a tais picos são produzidos pelo fungo, e não oriundos do meio de cultura.

Além disso, os cromatogramas mostram que os mesmos compostos majoritários, cujos picos apresentam tempos de retenção de 58,958 (Figura 2, pico 1) e 59,358 (Figura 2, pico 2) minutos estão presentes nos três extratos.

Uma análise preliminar, considerando a área de ambos os picos, mostrou que apenas o composto correspondente ao pico 1 teve sua eficiência de extração afetada pelo pH do filtrado de cultura. Para esse composto, a alcalinização do pH levou a uma diminuição da eficiência de extração. A área do pico 2 não sofreu alteração com a variação de pH do filtrado. Como os testes antibacterianos mostraram que não houve diferença significativa entre as atividades dos três extratos, e como os compostos correspondentes aos picos 1 e 2 são os componentes majoritários, pode-se inferir que o composto correspondente ao pico 2 seja o principal responsável pela atividade antibacteriana do extrato orgânico do filtrado da cultura do fungo.

Os espectros de massas correspondentes aos dois picos foram analisados e comparados com os espectros de massa da base de dados do equipamento. Entretanto, não foram encontradas compatibilidades, o que não permitiu a identificação preliminar dos compostos. Em trabalho futuro, o filtrado de cultura será submetido a fracionamento guiado por bioensaio para isolamento, purificação e identificação dos compostos majoritários por meio de técnicas espectroscópicas.

Discussão

Segundo Kusari e Spiteller (2011) apesar dos benefícios aparentes na utilização dos metabólitos secundários em escala industrial, ainda são poucos os estudos sobre a otimização de processos biotecnológicos capazes de produzir esses compostos em grande quantidade. Scherlach e Hertweck (2009) demonstraram que todas as práticas de fermentação são pouco eficientes para obtenção desses compostos, quando comparadas ao potencial do fungo em produzir essas moléculas no seu nicho ecológico. Portanto, as condições de cultivo *in vitro* não permitem a expressão constante de genes relacionados à biossíntese e necessários para uma maior produção de um metabolito secundário. Por isso, ocorre uma redução substancial na produção dessas moléculas nos cultivos axênicos.

Deste modo, estudos visando a otimização das condições de cultivo de endofíticos para obtenção desses compostos são de extrema importância no cenário de avaliação do potencial biotecnológico desses micro-organismos.

Dentro desta perspectiva, foi cultivado o endofítico *C. sativus* em diferentes meios de cultivo sobre condições de fotoperíodo e tempo de incubação diferentes para determinação da melhor condição de fermentação desse fungo. Ficou evidente que o cultivo em meio rico (BD), sob fotoperíodo e cultivado por 10 dias foi o que demonstrou maior eficiência na avaliação da atividade do extrato bruto contra fitopatógenos e bactérias.

Em estudos semelhantes, Molitor *et al.* (2012) usou diferentes meios de cultivo para otimizar a produção de compostos com atividade fitotóxica do fungo *Guignardia bidwellii*, e constataram que o meio rico Extrato de Malte foi o mais eficiente para a obtenção de maiores quantidades de compostos bioativos originários do metabolismo secundário. Do mesmo modo, Shan *et al.* (2014) conseguiram isolar nove novos compostos utilizando condições otimizadas de cultivo em meio rico BD por 7 dias sob rotação de 150 rpm e 25° C.

Wijeratne *et al.* (2014) com o objetivo de ampliar a busca por novos compostos, cultivaram o endofítico *Thievalia* sp. sob condições controladas de níveis de glicose no meio BD e, deste modo, conseguiram isolar novos antimicrobianos. Porém, segundo Varejão *et al.* (2013) meios com composição complexa podem dificultar os processos de isolamento de metabólitos, por isso, a utilização de meio semi-sintético ou sintético é preferível.

Kusari *et al.* (2014) demonstraram que as condições de cultura padrão *in vitro* não induzem a expressão dos agrupamentos de genes críticos às vias biossintéticas dos fungos endofíticos. Isso leva à produção de uma diversidade muito menor de metabólitos secundários do que o fungo tem potencial para produzir. Por este motivo, Ola *et al.* (2013) otimizaram o processo de obtenção de composto, propondo um modelo de

cocultura com o fungo endofítico *Fusarium tricinctum* com a bactéria *Bacillus subtilis* com o objetivo de induzir a produção de metabólitos secundários, resultando assim, em um implemento na obtenção dessas moléculas.

Lösgen *et al.* (2008) demonstraram a indução de vias do metabolismo secundário pela condição de cultivo do fungo endofítico *Chalara* sp. por um processo de fermentação líquido-superfície. Utilizando essa metodologia, eles conseguiram isolar novos compostos isofusidienois com atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*. Assim, otimizar as condições de fermentação em laboratório é o primeiro passo para se aumentar as chances do isolamento de moléculas estruturalmente novas.

Com base em nossos dados, fica evidente a significativa amplitude da atividade biológica dos extratos produzidos. Tal fato fica claro quando se observa a atividade antimicrobiana sobre os fungos fitopatogênicos e sobre as cepas de referência Gram-positivas testadas. Nota-se que os extratos só foram ativos sobre bactérias Gram-positivas. Por causa disso, podem ser propostas duas hipóteses, ou o mecanismo de ação desses compostos presentes no extrato bruto possuem alvos específicos para esse grupo de bactérias ou eles não foram capazes de penetrar nas bactérias Gram-negativas e assim não atingiram os seus alvos.

A atividade do extrato foi eficiente contra bactérias Gram-positivas. Li *et al.* (2014) conseguiram resultados semelhantes com antibacterianos produzidos pelo fungo endofítico *Eupenicillium* sp. Para isso, foi utilizada a fermentação em meio rico e as frações em acetato de etila exibiram atividade contra as bactérias *S. aureus* e *B. subtilis*. Por outro lado, eles conseguiram obter frações ativas contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *Acinetobacter* sp. Hassain *et al.* (2014) também demonstraram essa amplitude do efeito biológico de extratos fúngicos sobre diferentes cepas de referência.

Encontrar novos antibióticos para o tratamento de casos de infecções atuais é de extrema importância, uma vez que se observa o

aparecimento de bactérias resistentes, como a resistência exibida por *S. aureus* à meticilina e à vancomicina. Da mesma forma, o gênero *Enterococcus* tem surgido como um dos mais importantes patógenos hospitalares no mundo inteiro, permanecendo na terceira posição como agente mais comum de infecções, onde tem sido verificado o aumento cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (Takahashi *et al.*, 2008).

Os resultados dos testes antifúngicos demonstraram que houve inibição dos fungos *S. sclerotiorum* e *R. solani*, 52% e 29,69%, respectivamente.

O fungo *R. solani* provoca a podridão radicular no feijoeiro e é bastante comum na América Latina e em outras regiões do mundo (Bianchini *et al.*, 2005). Enquanto *S. sclerotiorum* se destaca por ser um importante fitopatógeno na agricultura mundial, pois tem uma ampla gama de hospedeiros. É o agente etiológico do mofo branco, principal doença no feijoeiro (Schwartz e Singh, 2013), e estudos recentes tem demonstrado a emergência de populações fungicida-resistentes (Amselem *et al.*, 2011). Assim, os compostos produzidos pelo endofítico *C. sativus* surgem como uma nova fonte de moléculas para o controle desses patógenos no campo.

Conclusões

Meio de cultura, fotoperíodo e tempo de incubação são determinantes para a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Compostos presentes nos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico *C. sativus* possuem potencial para o controle dos fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *R. solani*.

O extrato bruto produzido pelo fungo endofítico foram eficientes na inibição das bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecalis*.

Referências

Alurappa R, Bojgowda MRM, Kumar V, Mallesh NK, Chowdappa S (2014). Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. *Natural Product Research* 28(23): 2217-2220.

Amselem J, Cuomo CA, Van Kan JAL, Vlaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, Vries RP, Dyer OS, Fillinger S, Fournier E (2011). Genomic Analysis of the necrotrophic fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* 7(8): 1-27.

Bénéne E, Luz RAI, Vermeersch M, Cos P, Maes LA (2007). A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *Journal of Microbiological Methods* 71(2):101-106.

Bianchini A, Maringoni AC, Garneiro SMTPG (2005). Doenças do feijoeiro. In: Kimati H, Amorin L, Rezende JAM, Dergami Filho A, Camargo LEA (Ed.) (2005). Manual de fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas, p.333 – 349.

Campos FF, Rosa LH, Cota BB, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves TMA, Rosa CA, Zani CL (2008). Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2(12):1-12.

Chutia M, Deka BP, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology* 42(3):777–780.

CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Garcia A, Rhoden SA, Bernadi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA (2012). Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2(10):35-40.

Gonzaga LL, Costa LEO, Santos TT, Araújo EF, Queiroz MV (2014). Fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* endophytic community and have high genetic diversity, as determined by IRAP and REMAP markers. *Journal of Applied Microbiology*. 118:485—496.

Hussain H, Kliche-Spoy C, Al-Harrasi A, Al-Rawaki A, Abbas G, Freen IR, Schulz B, Krohn K (2014b). Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5224-5227.

Kusari S, Singh S, Jayabaskaran C (2014). Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *CellPress* 32(6)297-303.

Kusari S, Spiteller M (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural Product Reports* 28:1203–1207.

Li G, Kusari s, Lamshoft M, Schuffler A, Laatsch H, Spiteller M. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41. *Journal of Natural Products* 77:2335-2341.

Lösgen S, Magull J, Schulz B, Draeger S, Zeeck A (2008). Isofusidienols: Novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. *European Journal of Organic Chemistry* 698-703.

Molitor D, Liermann JC, Berkelmann-Lohnertz B, Buckel I, Opatz T, Thines E (2012). Phenguignardic acid and guignardic acid, phytotoxic secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *Journal of Natural Products* 75:265-1269.

Noyd RK (2000). Mycology reference cards. St. Paul, Minnesota. APS Press.

Ola ARB, Thomy D, Lai D, Brotz-Oesterhelt H, Proksch P (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products* 76:2094-2099.

Rekha D, Shivana MB (2014). Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of fungal endophytes in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and *Dactyloctenium aegyptium* (L.) P. Beauv. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 3(8):573-591.

Rönsberg D, Debbab A, Mándi A, Wray V, Dai H, Kurtán T, Proksch P, Aly AH (2013). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters* 54(25):3256–3259.

Santos TT (2014). Fungos endofíticos de *Phaseolus vulgaris* exibem atividade antimicrobiana e potencial para controle de fitopatógenos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa).

SAS INTITUTE. SAS 9.3 Output Delivery System: User's Guide. Cary, NC: SAS institute, 2011.

Scherlach K., Hertweck C (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7:1753–1760.

Shan T, Tian J, Wang X, Mou Y, Mao Z, Lai D, Dai J, Peng Y, Zhou L, Wang M (2014). Bioactive spirobisanthralenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp. *Journal of Natural Products*. 77:2151-2160.

Schwartz HF, Singh SP (2013). Breeding common bean for resistance to White mold: A Review. *Crop Science* 53:1832-1844.

Takahashi JA, Castro MCM, Souza GG, LUCAS EMF, Bracarense AAP, Abreu LM, Marriel IE, Oliveir MS, Floreano MB, Oliveira TS (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Medical Mycology* 18(4):198-204.

Varejão EVV, Demuner AJ, Barbosa LCA, Barreto RW (2013). The search for new natural herbicides e strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection* 48:41 – 50.

Wężowicz K, Rozpądek P, Turnau K (2014). The diversity of endophytic fungi in *Verbascum lychnitis* from industrial areas. *Symbiosis* 54:139-147.

Wijeratne EK, Espinosa-Artiles P, Gruner R, Gunatilaka AAL (2014). Thielavialides A–E, Nor-Spiro-azaphilones, and a Bis-spiroazaphilone from *Thielavia* sp. PA0001, An Endophytic Fungus Isolated from Aeroponically Grown *Physalis alkekengi*. *Journal of Natural Products* 77:1467-1472.

Tabela 1. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos produzidos, em diferentes condições de crescimento, pelo fungo endófito *Cochliobolus sativus*.

Extrato Bruto	Condição de Obtenção	Crescimento Micelial (mm)				Inibição do crescimento (%)			
		<i>Ss</i>	<i>Rs</i>	<i>Fo</i>	<i>Cl</i>	<i>Ss</i>	<i>Rs</i>	<i>Fo</i>	<i>Cl</i>
E1	BD, SF, 10 dias	72,0 c	68,7 cdb	80,2 ab	49,58 a	17,15	21,07	1,84	11,19
E2	MM, F, 10 dias	87,0 a	76,3 abcd	76,7 b	53,25 a	0	12,26	6,02	4,63
E3	Czapek, SF, 10 dias	87,0 a	81,0 abc	75,7 b	55,83 a	0	6,90	7,35	0
E4	BD, F, 10 dias	41,7 c	61,2 d	75,0 b	55,83 a	52,01	29,69	8,16	0
E5	MM, SF, 10 dias	87,0 a	84,7 ab	81,0 ab	52,33 a	0	2,68	0,82	6,27
E6	Czapek, F, 10 dias	85,2 ab	74,2 abcd	80,2 ab	49,92 a	2,01	14,75	1,73	10,60
E7	BD, SF, 20 dias	87,0 a	64,0 cd	77,1 ab	50,08 a	0	26,44	5,61	10,30
E8	MM, F, 20 dias	87,0 a	77,0 abcd	76,0 b	55,83 a	0	11,49	6,94	0
E9	Czapek, SF, 20 dias	87,0 a	66,5 cd	77,7 ab	55,83 a	0	23,56	4,90	0
E10	BD, F, 20 dias	87,0 a	63,4 d	77,7 ab	52,58 a	0	27,11	4,90	5,82
E11	MM, SF, 20 dias	87,0 a	87,0 a	79,5 ab	55,83 a	0	0	2,65	0
E12	Czapek, F, 20 dias	78,9 b	70,8 abcd	80,0 ab	51,50 a	9,29	18,58	2,04	7,76
Controle		87,0 a	87,00 a	81,7 ab	55,83 a				

As Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os extratos brutos foram testados na concentração de 100 µg mL⁻¹. As siglas: *Ss*, *Sclerotinia sclerotiorum*; *Rs*, *Rizoctonia solani*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Cl*, *Colletotrichum lindemuthianum*; BD, Meio Batata Dextrose Caldo; MM, Meio Mínimo Caldo; F, Com fotoperíodo de 12 horas; SF, Sem Fotoperíodo (Cultivo no escuro).

Tabela 2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos produzidos, em diferentes condições de crescimento, pelo fungo endofítico *Cochliobolus sativus*.

Extrato Bruto	Condição de Obtenção	Gram positiva			Gram negativa		
		<i>S. a.</i>	<i>B. s.</i>	<i>E. f.</i>	<i>P. a.</i>	<i>P. v.</i>	<i>E. c.</i>
E1	BD, SF, 10 dias	5,33 b	4,78 c	4,11 b	-	-	-
E2	MM, F, 10 dias	3,67 b	3 e	3,44 cbd	-	-	-
E3	Czapek, SF, 10 dias	3 b	5,11 c	4,11 b	-	-	-
E4	BD, F, 10 dias	12,3 a	10 a	6,88 a	-	-	-
E5	MM, SF, 10 dias	3 b	3,22 de	3 d	-	-	-
E6	Czapek, F, 10 dias	5,67 b	6,78 b	4 bc	-	-	-
E7	BD, SF, 20 dias	3,44	4,11 cde	3,55 bcd	-	-	-
E8	MM, F, 20 dias	3 b	3 e	3 d	-	-	-
E9	Czapek, SF, 20 dias	3 b	5,11 c	3 d	-	-	-
E10	BD, F, 20 dias	5,78 ab	4,33 cd	4 bc	-	-	-
E11	MM, SF, 20 dias	3 b	3 e	3 d	-	-	-
E12	Czapek, F, 20 dias	4,67 b	3,22 de	3,33 cd	-	-	-
Controle		3 b	3 e	3 d	-	-	-

As Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os extratos brutos foram testados na concentração de 1mg mL⁻¹. DMSO foi utilizado como controle negativo. As siglas: *S. a.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *B. s.*, *Bacillus subtilis* ATCC 23857; *E. f.*, *Enterococcus faecalis*; *P. a.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25238; *P. v.*, *Proteus vulgaris* ATCC 13315; *E. c.*, *Escherichia coli* ATCC 29214; BD, Meio Batata Dextrose Caldo; MM, Meio Mínimo Caldo; F, Com fotoperíodo de 12 horas; SF, Sem Fotoperíodo (Cultivo no escuro).

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico *Cochliobolus sativus*.

Bactéria	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Gram-positiva	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	68
<i>Enterococcus faecalis</i>	68
Gram-negativa	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25238	NA
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	NA

NA - Extrato não ativo na concentração $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cloranfenicol, em diversas concentrações, foi utilizado como controle positivo e DMSO como controle negativo.

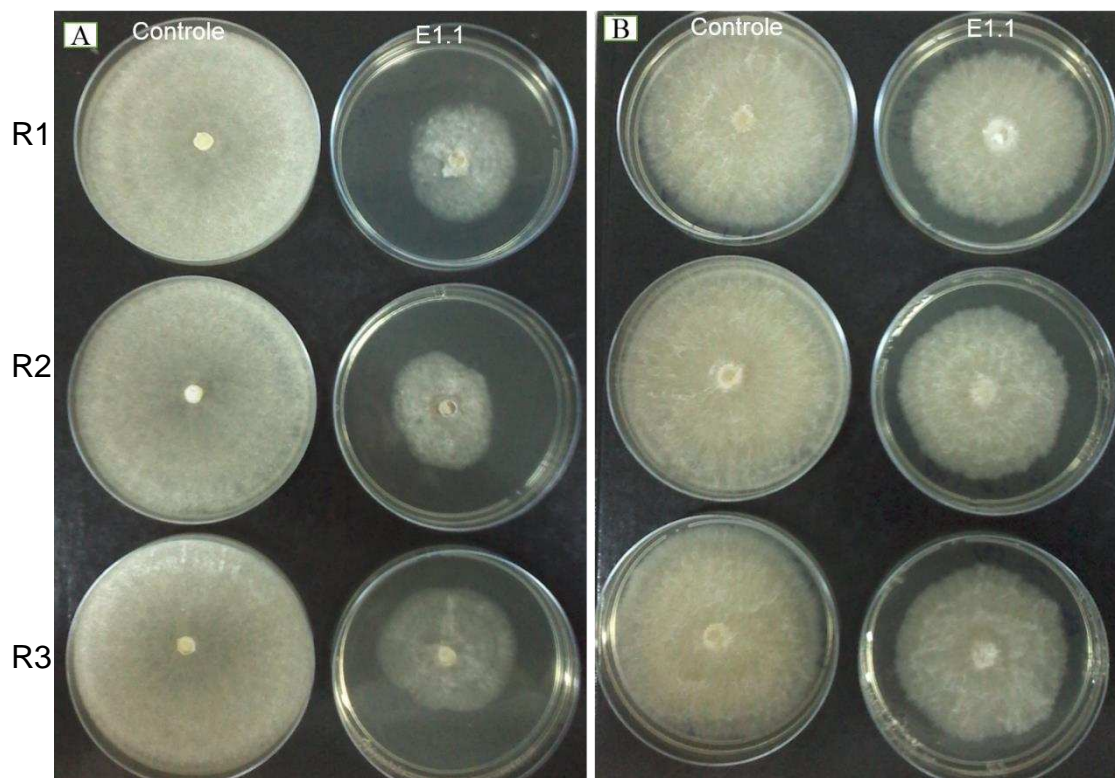


Figura 1. Inibição do crescimento micelial, *in vitro*, de fungos fitopatogênicos pelo extrato bruto de metabólitos produzidos pelo fungo endofítico *Cochliobolus sativus*. A) Fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*; B) Fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*. Cultivados em BDA, à 25° C por 3 dias. R1, R2 e R3 representam as três repetições realizadas.

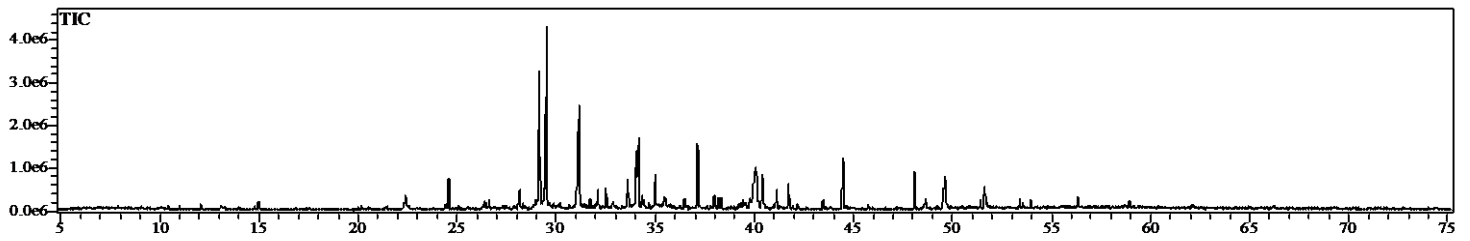
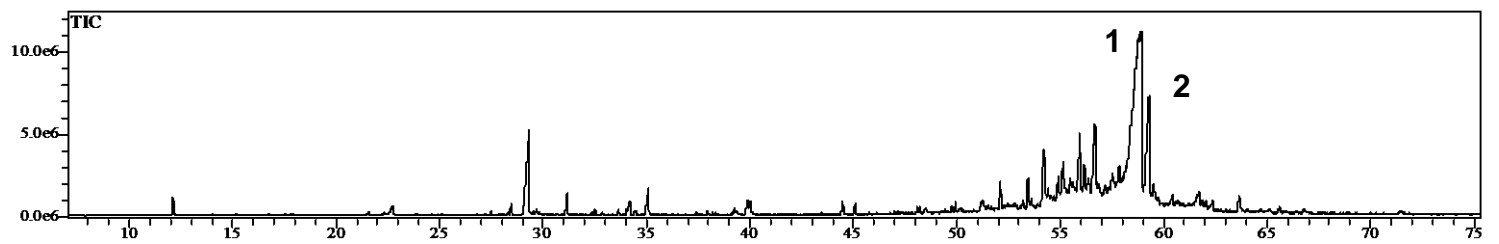
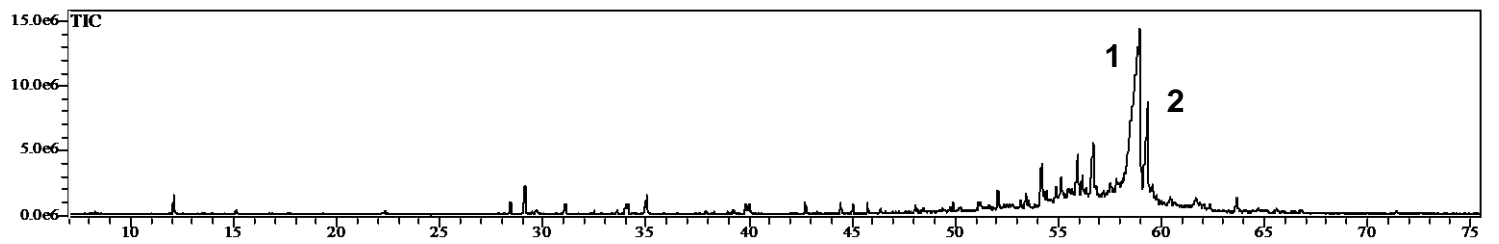
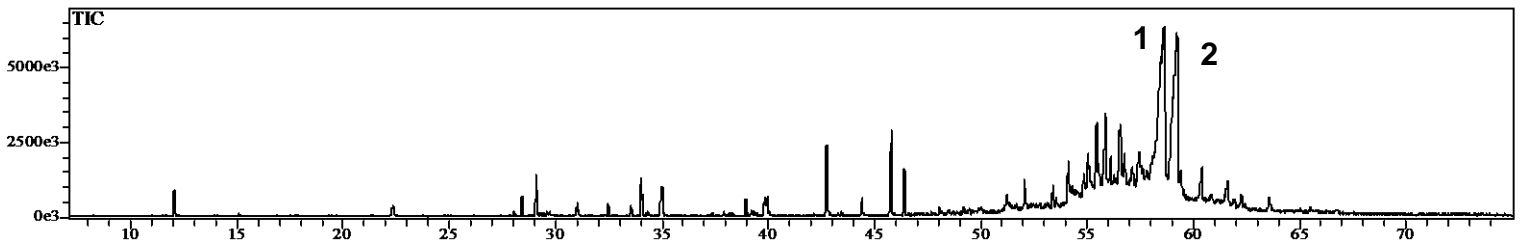
A**B****C****D**

Figura 2. Cromatogramas de íons totais dos extratos em acetato de etila dos filtrados de cultura. A) meio de cultivo não inoculado, B) pH 4,6 (não ajustado); C) pH ajustado a 3,5; D) pH ajustado a 8,0.