

# DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE EXTRATOS METANÓLICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *MIKANIALAEVIGATA* CONTRA QUATRO CEPAS DE *SALMONELLA*

**Isabella Mary Alves Reis<sup>1</sup>; Alexsandro Branco<sup>2</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [isabella.alvesreis@gmail.com](mailto:isabella.alvesreis@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [branco@uefs.br](mailto:branco@uefs.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Mikania laevigata*, Fungos endofíticos, Xylariaceae.

## INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta grande tradição no uso da matéria prima vegetal como forma de tratamento alternativo não somente pela abundância e diversidade da flora como também por questões culturais. Entre as plantas da flora brasileira utilizadas destaca-se a *Mikania laevigata* (Asterceae), conhecida popularmente como cipó-catinga, coração-de-jesus, erva-de-cobra, guaco, guaco-trepador (GUPTA, 1995).

Sendo, utilizada principalmente pelas suas propriedades sobre as vias respiratórias (TESKE; TRENTINI, 1997), propriedades antimicrobianas (AMARAL et al., 2003) e antiinflamatórias (FALCÃO et al., 2005), também são atribuídas à espécie os efeitos broncodilatadores, antiespasmódicos, antiulcerosos e antirreumáticos (GUPTA, 1995; PEREIRA et al., 1994, MOSADDIK; ALAM, 2000). A análise fitoquímica desta espécie revelou a presença de vários constituintes, principalmente a cumarina e seus derivados (OLIVEIRA et al., 1984).

Não consta na literatura estudos sobre fungos endofíticos de *Mikania laevigata*. Os endófitos são uma classe de microorganismos que vivem no interior de tecidos vegetais em pelo menos um período de seus ciclos de vida sem lhes causar sintomas evidentes de doenças.

A detecção de fungos endofíticos no interior de plantas saudáveis e a relação que estes microrganismos estabelecem com seus hospedeiros abrem novas perspectivas para o estudo das interações fungos-planta. Desta forma, os endófitos têm atraído a atenção por serem considerados fontes promissoras de metabólitos secundários e conseqüentemente fontes geradoras de novos produtos bioativos.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi cultivar fungos endofíticos de *Mikania laevigata* para investigar a antimicrobiana contra quatro cepas de *Salmonella*.

## METODOLOGIA

### 1. Cultivo dos fungos endofíticos isolados de *Mikania laevigata*

Foram cultivados isolados fúngicos de 15 diferentes fungos endofíticos de *Mikania laevigata*. Estes fungos foram previamente isolados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica e para a realização da atividade biológica precisaram ser novamente cultivados. As amostras do micélio dos fungos endofíticos, que encontravam-se armazenadas, foram colocadas em meio de cultura BDA, suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) e Rosa de Bengala (25 µg/mL) e incubadas em estufa tipo B.O.D, a 28°C, por quatro semanas.

### 2. Obtenção dos extratos de *Mikania laevigata*

O material fúngico foi então filtrado para separar micélio e sobrenadante. Na filtração foi utilizada uma bomba de vácuo para otimizar o processo. Após esta etapa, o sobrenadante (filtrado aquoso) foi estocado em geladeira.

O micélio foi macerado com um pouco de metanol e ao volume de cada frasco foi acrescentado 100 mL de metanol, essa extração foi realizada sob refluxo, por duas horas. Em seguida, o material foi filtrado, o micélio foi congelado em freezer e a fração metanólica concentrada.

### 3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) recomendada pelo CLSI (2003a) para bactérias.

Apenas 12 dos 15 extratos possuíam massa para realização dos ensaios. Sendo que, cada extrato foi dissolvido em DMSO, e água (50:50) para diminuir o potencial inibitório do DMSO e, em seguida, o extrato foi esterilizado por filtração através da membrana de acetato celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ).

Diluições do antibiótico cloranfenicol, na concentração estoque de 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  respectivamente, foram utilizadas como controles positivos para fins de comparação de dados entre experimentos independentes e como indicadores para avaliação relativa do nível de inibição das amostras testadas. Foram realizados também controles de viabilidade dos micro-organismos testados, da esterilidade do meio de cultura, do extrato e do potencial de inibição do DMSO sobre os micro-organismos testados.

Determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra *S. enteritidis* CCMB 513, *S. Carrau* CMBB 514 e dois isolados de alimentos (*Salmonella sp.* CCMB 270 e CCMB 281).

### 4. Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Após a determinação da CIM, realizou-se a concentração microbicida mínima (CMM). Para isso, utilizaram-se placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Das amostras que apresentaram resultado positivo no CIM foram retiradas alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  dos poços e plaqueadas sobre AMH. As placas de AMH contendo as bactérias foram incubadas a 28°C por 48h. A CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram cultivados 15 fungos endofíticos diferentes. Esses microrganismos foram previamente identificados até o gênero, em trabalhos anteriores pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica, assim os fungos cultivados pertencem a família Xylariaceae.

Os fungos identificados em gênero são três espécies de *Nodulisporium*, três espécies de *Hypoxylon* e uma de *Daldinia*. As espécies restantes ainda não foram identificadas e foram denominadas MMX 3, MMX 4, MMX 8, MMX 9, MMX 10, MMX 11, MMX 12 e MMX 14.

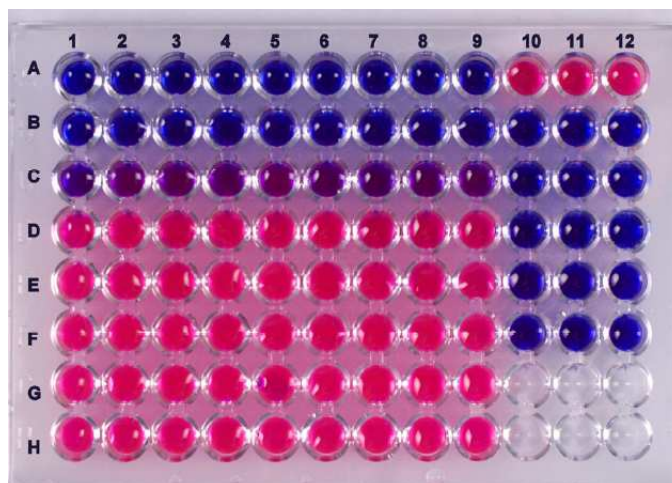
Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) apenas doze das quinze cepas foram utilizadas, pois três extratos não possuíam a quantidade de massa suficiente para realização dos ensaios.

A técnica de diluição para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) junto com outros sistemas de diluição de antibióticos é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (REIS, 2006).

O controle DMSO apresentou inibição do crescimento em uma diluição correspondente a 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  do extrato. Portanto, os resultados foram considerados representativos para valores de CIM iguais ou abaixo da diluição inferior seguinte dos extratos testados, isto é 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ . O DMSO é uma substância que facilita a difusão, mas pode aumentar a atividade do agente antimicrobiano, por isso foi necessário realizar o controle. Todos os extratos testados demonstrado possuir atividade antimicrobiana menor do que o valor representativo de DMSO para a CIM.

Nenhum dos extratos testados mostrou atividade contra todos os microorganismos, porque alguns valores de CIM obtidos foram  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e assim não foram considerados como representativos. No entanto, o fato de não mostrar atividade antimicrobiana detectáveis não significa que os extratos de fungos avaliados não possuem compostos bioativos contra os microorganismos testados.

A cepa de *Salmonellaenteritidis* CCMB 523 parece ser mais sensível em comparação com os demais extratos testados, uma vez que foi inibida a  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  por 6 (60%) dos extratos avaliados (Figura 1). Sob as mesmas condições, *SalmonellaCarrau* CCMB 523 foi inibida por 4 (40%), *Salmonella sp.* CCMB 270 foi inibida por 2 (20%) dos extractos avaliados, enquanto *Salmonella sp.* CCMB 281 não foi inibida a esta concentração por nenhum dos extratos testados, mostrando-se como a cepa mais resistente entre as testadas.



**Figura 1.** Determinação da concentração inibitória mínima. Representação de diluição em série de extratos metanólico contra a *Salmonella enteritidis*. Colunas 1-3: extrato FEX 14, MIC =  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Colunas 4-6: *Hypoxylon sp.* (Especie 3) extrato MIC =  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e Coluna 7-9: extrato FEX 12, MIC =  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A linha de 10-11-12: controle de crescimento dos microorganismos testados. Linhas B 10-11-12, C 10-11-12 e D 10-11-12: controle de extratos e linhas E 10-11-12 e F 10-11-12: Controle da esterilidade do meio de cultura (HCM).

Através da utilização da CIM foi possível demonstrar quantitativamente a concentração dos extratos que inibiram cada microorganismo, mas este teste apenas indica a concentração capaz de causar a inibição do crescimento e não identifica se a inibição era bactericida ou bacteriostática. Para isso, foi utilizado o teste da concentração mínima de microbicida (MMC). Observando os resultados, o extrato de *Nodulisporium sp.* (espécie 1) e MMX3 apresentaram atividade microbicida até  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra *Salmonella sp.* CCMB 270. A maioria das amostras estudadas demonstrou MMC =  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  para *Salmonella sp.* CCMB 270 e *Salmonella sp.* CCMB 281.

## CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos mostram-se como uma fonte promissora de biocompostos, assim, o presente trabalho contribui para o conhecimento científico dos fungos endofíticos presentes em uma espécie *Mikania laevigata*.

Os estudos de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* mostram que todos os doze extratos possuíram algum tipo de atividade contra pelo menos uma das quatro cepas de *Salmonella*.

Sendo que cepa da *Salmonellaenteritidis* CCMB 523 apresentou-se como a mais sensível, sendo inibida na concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  por 60% dos extratos avaliados. Já a cepa de *Salmonella sp.* CCMB 281 não foi inibida a esta concentração por nenhum dos extratos testados, mostrando-se como a cepa mais resistente.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, R.R. et al. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania Glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 13, p. 24-27, 2003.
- FALCÃO, H.S. et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 381-391, 2005.
- GUPTA, M.P. 270 **Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santa Fé de Bogotá: Presencia, 1995. 617p.
- PEREIRA, N.A. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isoalted constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.
- PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-186, 1992.
- REIS, M.O.R. (2006). **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico das folhas de Persea gratissima Gaertn – Abacateriro (Lauraceae)**. Dissertação do Mestrado em Promoção da Saúde, Universidade de Franca, Franca-SP.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba, Herbarium, 1997.
- OLIVEIRA, F. et al. Isolation and identification of components of *Mikania glomerata* Spreng, e *Mikania laevigata* Schultz Bib ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20, n2, p. 169-833, 1984.