

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA PLANTA *CATHARANTHUS ROSEUS*: UMA FONTE PROMISSORA DE METABÓLITOS BIOATIVOS

ANA CLARA FERREIRA¹, JOSE AMERICO G. B. FILHO ², MARCOS VENICIUS DE CASTRO ³

¹ Aluna do curso Técnico de Informática integrado ao Ensino Médio, Bolsista PIBIC-EM-CNPq, IFSP, Campus São João da Boa Vista, clara.ferreira1@aluno.ifsp.edu.br.

² Técnico de laboratório de química, Campus São João da Boa Vista, jose.brito@ifsp.edu.br

³ Professor Doutor em Ciências – Química Orgânica e biológica, Campus São João da Boa Vista, marcos.castro@ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.06.01.05-8 Química dos Produtos Naturais

RESUMO: Os fungos são bem conhecidos por serem produtores de metabólitos secundários bioativos. Entre os fungos filamentosos, os endofíticos são o grupo mais produtivo quimicamente. Segundo vários pesquisadores eles têm uma produção de metabólitos secundários superior a outros fungos. Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior dos tecidos de plantas como simbioses mutualísticas sem causar danos ou doenças, e vêm sendo considerados como uma nova e promissora fonte de compostos bioativos que podem ter ação contra células tumorais, vírus, bactérias, protozoários, helmintos e contra outros fungos. A planta *Catharanthus roseus*, também conhecida como vinca-de-madagascar, é uma espécie que pertence à família Apocynaceae. É nativa da ilha de Madagascar e amplamente cultivada no mundo. A planta contém vários alcaloides, incluindo a vincristina e a vinblastina, que são usados no tratamento de câncer. Vários alcaloides, inicialmente, isolados de plantas foram posteriormente isolados de fungos endofíticos, indicando que esses fungos podem, eventualmente, ser os verdadeiros produtores de metabólitos isolados de plantas, evidências que têm múltiplas consequências do ponto de vista científico e tecnológico. Este projeto objetiva o isolamento e cultivo de fungos endofíticos da planta *Catharanthus roseus*, para obtenção de extratos que serão avaliados quanto a presença de alcaloides e atividade antibiótica.

PALAVRAS-CHAVE: alcaloides; vinca; extratos; antibiótico

ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM THE PLANT *CATHARANTHUS ROSEUS*: A PROMISING SOURCE OF BIOACTIVE METABOLITES

ABSTRACT: Fungi are well known for being producers of bioactive secondary metabolites. Among filamentous fungi, endophytic fungi are the most chemically productive group. According to several researchers, they have a higher production of secondary metabolites compared to other fungi. Endophytic fungi are microorganisms that live within the tissues of plants as mutualistic symbionts without causing harm or disease, and they have been considered a new and promising source of bioactive compounds that may act against tumor cells, viruses, bacteria, protozoa, helminths, and other fungi. The plant *Catharanthus roseus*, also known as Madagascar periwinkle, is a species belonging to the Apocynaceae family. It is native to the island of Madagascar and widely cultivated around the world. The plant contains several alkaloids, including vincristine and vinblastine, which are used in cancer treatment. Several alkaloids initially isolated from plants have subsequently been isolated from endophytic fungi, indicating that these fungi may eventually be the true producers of metabolites isolated from plants, evidence that has multiple implications from both scientific and technological perspectives. This project aims to isolate and cultivate endophytic fungi from the plant *Catharanthus roseus* to obtain extracts that will be evaluated for the presence of alkaloids and antibiotic activity.

KEYWORDS: alkaloids; vinca; extrates; antibiotic

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos têm atraído grande interesse biotecnológico desde os anos 1990 (Zhang et al., 2006). Suas interações com plantas podem ser simbióticas ou tróficas (Souza et al., 2004). Nas interações mutualísticas, os fungos endofíticos podem produzir metabólitos que podem conferir vantagens adaptativas à planta hospedeira (Rodrigues e Dias Filho, 1996; Peixoto Neto et al., 2002).

Esses fungos são considerados potenciais produtores de metabólitos bioativos inicialmente isolados de plantas. Por exemplo, o paclitaxel, isolado da *Taxus brevifolia*, foi posteriormente identificado em extratos do fungo endofítico *Taxomyces andreanea* (Stierle e Strobel, 1993). Da mesma forma, os alcaloides vincristina e vinblastina, isolados da planta *Catharanthus roseus* em 1958, também foram detectados no fungo *Talaromyces radicus* (Palem et al., 2015). Esses achados indicam que endófitos podem ser uma alternativa sustentável para a produção desses compostos, preservando a biodiversidade vegetal.

A planta *Catharanthus roseus*, também conhecida como vinca, é nativa de Madagascar e amplamente distribuída no Brasil (Flora do Brasil, 2020). Ela produz diversos alcaloides com propriedades medicinais, como vincristina e vinblastina, produzidos nas folhas e usados no tratamento do câncer (Valente et al., 2022), além de compostos com atividade anti-hipertensiva produzidos nas raízes (Mishra et al., 2001; Santos et al., 2009). Ao todo, mais de 130 alcaloides já foram isolados dessa planta (Wang et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento de fungos endofíticos potencialmente produtores de alcaloides e de compostos com atividade antimicrobiana, a partir de folhas, caules e raízes da planta *Cantharathus roseus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de caule, folha e raiz da planta *Catharanthus roseus* foram coletadas, para a realização dos testes. O material coletado foi esterilizado superficialmente pela seguinte sequência: Imersão em etanol 70% por 1 min, solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 2 minutos e três banhos sucessivos em água destilada estéril (3 min/cada). Após a esterilização, o material vegetal foi cortado em pedaços menores e colocado em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram deixadas em uma estufa bacteriológica a 28°C, até a formação de colônias. À medida que foi observado crescimento, os microrganismos foram inoculados em placas contendo o mesmo meio e submetidos a repiques sucessivos, a fim de garantir a pureza do isolado.

Após o crescimento das colônias - dos organismos já puros - foi retirado 5 discos contendo 6 mm de diâmetro e inoculados em 100 ml de meio ISP-2 modificado contendo a seguinte composição em gramas/litro: Extrato de levedura (4,0), Extrato de malte (10,0), Amido (5,0). Os meios líquidos foram incubados por um período de 21 dias a 28°C. Após este período o meio foi filtrado e realizado um processo de extração dos alcaloides.

O filtrado foi acidificado até pH 1 ou 2, utilizando-se uma solução de ácido clorídrico 1 M. Após a acidificação a amostra foi colocada em um funil de separação e foi realizada uma partição líquido-líquido com hexano para retirada de ceras e gorduras. A fração aquosa acidificada livre de interferentes lipofílicos foi submetida à uma nova partição com acetato de etila, para a retirada dos extratos de média polaridade. A fração acetato de etila foi guardada e evaporada. A fração aquosa foi alcalinizada até pH 9 ou 10, utilizando-se uma solução de hidróxido de amônio. O meio, já alcalinizado, foi colocado em um funil de separação e particionado com igual volume de acetato de etila, para a retirada dos alcaloides. A fração acetato foi novamente coletada e evaporada. O extrato seco foi pesado e utilizado para testes de detecção de alcaloides, bem como testes de atividade antimicrobiana em organismos pré-selecionados.

Após serem pesados, os extratos foram solubilizados em 5 ml de Metanol e alíquotas contendo 10, 20 e 50 µg/ml foram utilizadas para umedecer discos de papel de 6 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos para placas contendo o microrganismo teste, seguida de incubação a 30°C, por 24 a 48 horas. Os halos de inibição foram medidos no final do procedimento.

Por fim, foi realizado o teste para a detecção da presença de alcaloides. Para tal, os extratos foram novamente suspensos em 2 mL de Metanol, sendo, em seguida, transferidos para tubos de ensaio. Posteriormente, adicionou-se o reagente de Dragendorff para a identificação dos alcaloides.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer do presente estudo, inicialmente foram obtidas 50 linhagens, distribuídas entre caule, folha e raiz. No entanto, ao longo do processo de isolamento, resultaram apenas 35 linhagens puras, sendo 9 provenientes do caule, 9 da folha e 17 da raiz. É possível que os compostos produzidos pela planta atuem no controle da população de microrganismos nas folhas e nos caules e em menor escala nas raízes, uma vez que as quantidades de microrganismos isolados nas raízes foram muito superiores. Segundo Mishra, et al (2001) e Santos et al., (2009) a planta *Cantharathus roseus* possui produção diferencial de compostos nas folhas e raízes.

A redução significativa no número de linhagens deveu-se a fatores diversos, dentre os quais se destacam as contaminações ocorridas. O processo de purificação envolve o repique sucessivo dos isolados e neste processo é normal a ocorrência de perda de linhagens.

Dentre as 35 linhagens fúngicas isoladas, foram selecionadas 23 para a inoculação em meio ISP-2 modificado, visando à subsequente avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos.

O acetato de etila foi empregado tanto na extração dos extratos de média polaridade quanto na extração dos alcaloides.

Vale ressaltar que, embora o objetivo principal do projeto seja a extração e realização de testes com alcaloides, tomamos a decisão de isolar também os extratos de média polaridade, como exposto anteriormente. Esta escolha não se deu por acaso; os extratos de média polaridade possuem um potencial significativo que pode se revelar de grande relevância para estudos e testes futuros.

Tal procedimento, de acidificação do meio para a extração dos extratos de média polaridade e posterior basificação para a extração dos alcaloides, é justificado pelas propriedades químicas distintas dessas substâncias. Em um meio ácido, os alcaloides que são compostos nitrogenados geralmente básicos, se encontram na forma de sais, que são mais solúveis na fase aquosa, assim pode-se extrair outros compostos, de média e baixa polaridade, no acetado de etila, mantendo-se os alcaloides na fase aquosa. A basificação, do meio, promove a conversão dos alcaloides para a forma de bases livres, tornando-os menos polares e, portanto, mais solúveis em solventes orgânicos apolares ou de baixa polaridade, como o acetato de etila. Esse processo facilita a extração, eficiente, de frações contendo apenas alcaloides.

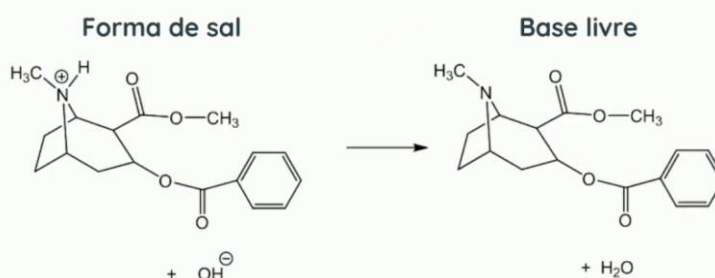


FIGURA 1. Conversão dos alcaloides da forma de sal para a forma de base livre.

Abaixo encontram-se os resultados obtidos ao fim das partições e posterior secagem e pesagem dos extratos.

TABELA 1. Relação massa e quantidade de extrato

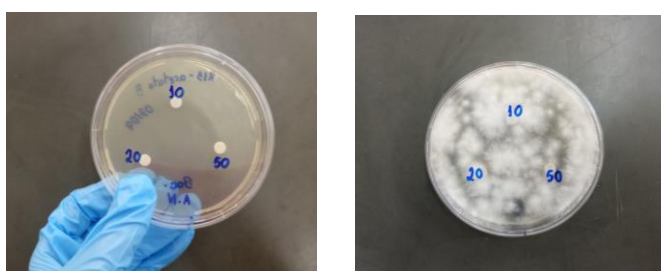
Peso (mg)	Quantidade de extrato	
	Extratos de média polaridade	Extratos com alcaloides
De 1 a 20	12	20
De 21 a 30	4	2
De 31 a 40	3	0

De 41 a 50	0	1
Total	19	23

A partir da análise dos dados, verificou-se que, dos 42 extratos avaliados, a maioria (32 extratos) apresentou massas variando entre 1 e 20 mg. A baixa massa dos extratos pode ser explicada devido a uma prática comum, na área de produtos naturais, que é o cultivo dos fungos em um volume reduzido de meio para testes e avaliações preliminares. A partir de resultados positivos, procede-se ao cultivo em maior escala, permitindo a obtenção de maiores quantidades de extrato. Dentre os 32 extratos, 20 eram provenientes das frações obtidas pela metodologia de extração de alcaloides, enquanto 12 eram de frações que foram obtidas pela metodologia de extração de compostos com média polaridade. Entre os extratos com massas superiores a 20 mg, apenas três eram das frações alcaloídicas, enquanto sete eram de frações de compostos de polaridade média. Esses resultados refletem a maior diversidade de compostos de polaridade média em relação aos alcaloides.

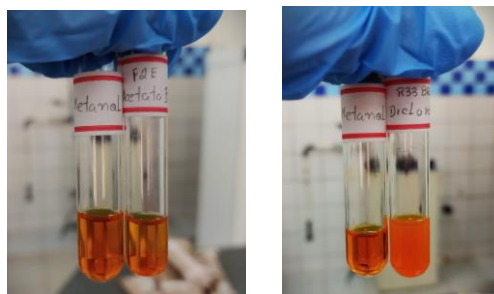
Após a pesagem, foram selecionados 6 fungos para a realização da avaliação da atividade antimicrobiana, sendo eles: C4-diclorometano; C16-acetato B; F11-acetato 2; F13A-diclorometano; R13-acetato B; e R18B-acetato B. Além disso, foram usados dois organismos teste, sendo uma bactéria (*Acidovorax* sp.) e um fungo (*Sclerotium rolfsii*).

Não obtivemos resultados com o teste utilizando a bactéria *Acidovorax* sp. Os experimentos foram repetidos por 3 vezes, seguindo a metodologia proposta, porém não foi observado o crescimento das bactérias, como não havia mais tempo para realização de novos experimentos não foi possível avaliar a atividade dos extratos sobre este microrganismo. Por outro lado, obtivemos sucesso no crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii* porém não observou-se inibição nas concentrações testadas. Mediante o resultado, novas avaliações experimentais serão conduzidas, a fim de aprofundar a investigação e obter dados complementares que possam elucidar o comportamento em diferentes condições.



FIGURAS 2 e 3. Placa contendo a bactéria (R13-acetato B) e placa contendo o fungo (C4 dicloro).

Por fim, foi realizada a avaliação da presença de alcaloides. Foram testados os seguintes extratos: C9-diclorometano, C4-diclorometano e R33B2-diclorometano, os quais apresentaram ocorrência positiva, ou seja, turvação ou precipitação das amostras, evidenciando a presença de alcaloides; e os extratos F2E acetato B, F13A diclorometano, R18-A acetato B, R18B acetato B e C10B diclorometano que não apresentaram qualquer indicio de alcaloides. Para fins de comparação, optou-se por utilizar dois tubos de ensaio, um contendo apenas Metanol (à esquerda) e outro contendo o extrato (à direita).



FIGURAS 4 e 5. Sem presença de alcaloide (F2E-acetado B); com presença de alcaloide (R33B2 diclorometano).

A análise dos resultados obtidos ao longo do experimento revelou uma possível relação entre a massa dos extratos testados e a presença de alcaloides. Os dados indicam que os extratos que exibiram resultado positivo para a presença de alcaloides apresentaram massas variando entre 5,9 e 16,1 mg. Por outro lado, os extratos que não revelaram qualquer alcaloide possuíam massas consideravelmente menores, entre 1,4 e 3 mg. Essa diferença sugere que a quantidade de material disponível para o teste pode ter influenciado a detecção destes compostos nas amostras, afinal, é possível que uma menor quantidade de extrato tenha limitada a concentração de alcaloides a níveis indetectáveis pelo reagente utilizado, o que reforça a necessidade de experimentos adicionais.

A baixa massa dos extratos é justificada pelo cultivo, dos fungos, em volumes limitados de meio de cultura durante as fases preliminares de avaliação, o que reduziu a quantidade das amostras; outro fator que impactou nesse resultado foi a prioridade dada a uma parceria firmada com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na qual foi enviado amostras de todos os extratos obtidos, a fim de realizar testes avançados, como a citotoxicidade em células de câncer e análises por LC-MS/MS (Espectrometria de Massas).

CONCLUSÕES

A parte da planta da qual obteve-se a maior quantidade de microrganismos foram as raízes. Os extratos que foram obtidos com as maiores massas correspondem a fração acetato acidificado que são os compostos de baixa a média polaridade. Já as frações contendo alcaloides apresentaram menores massas. Não foi possível avaliar a atividade dos extratos frente a bactéria *Acidovorax* sp. Os extratos, nas concentrações de 10, 20 e 50 µg não apresentaram atividade contra o fungo *Sclerotium rolfsii*. Com relação a presença de alcaloides foi possível detectar a presença destes compostos nas frações que apresentavam massas acima de 5,9 mg.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A.C.F atuou na execução das atividades do projeto, bem como na redação do trabalho. J.A.G.B.F auxiliou no processo de testes, disponibilizando materiais e local de trabalho. M.V.C - foi o orientador do projeto - procedeu com a metodologia e experimentos, além de contribuir com a curadoria e análise dos dados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Doutor Marcos Venicius de Castro, pela orientação. Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus São João da Boa Vista, pelo fornecimento de apoio e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço a CAPES pela bolsa de ensino PIBIC-EM - CNPq (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica voltados aos alunos do Ensino Médio), que tornou este projeto possível.

Agradeço ao IFSP - Campus de Matão por disponibilizar o laboratório e emprestar o rota-evaporador, a Técnica de Laboratório Rosangela Teodoro Dos Santos Souza por contribuir com a obtenção dos organismos testes; e a Professora Dra. Karen de Jesus Nicasio pelo auxílio na metodologia e na execução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

Flora do Brasil. (2020). Apocynaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB33737> . Acesso em: 19 de abr. 2023.

MISHRA, P.; UNİYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent Genetic Resources and Crop. Evolution, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1011218329118>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011218329118>. Acesso em 29 de mai. 2023.

PALEM, P. P. C.; KURIAKOSE G. C.; JAYABASKARAN, C. Correction: An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*, Isolated from *Catharanthus roseus*, Produces Vincristine and Vinblastine, Which Induce Apoptotic Cell Death. PLOS ONE. v. 11, n. 4, p. 1-22, 2015. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144476>. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0144476>. Acesso em 29 de mai. 2023.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 29, 2002. 62 77p. ISSN-L: 1414-4522.

RODRIGUES, K.f.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola* Pesq. Agropec. Bras, v. 31, n. 12, p. 905-909, 1996. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285886204_Fungal_endophytes_in_the_tropical_grasses_Brachiaria_brizantha_cv_marandu_and_B_humidicola. Acesso em fev. 2022.

SANTOS, M. C.A.; FREITAS, S. P.; AROUCHA, E. M. M.; SANTOS, A. L. A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 9, n. 1, p.24- 30, 2009. ISSN: 1519-5228. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/500/50016921004.pdf>. Acesso em 19 de abr. 2023.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico Semina. Ciências Biológicas e da Saúde, v. 32, n. 2, p. 199-211, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n2p199>. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/8241/0>. Acesso em fev. 2022.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham Acta Amazonica v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aa/a/zCwJfGvRCwZ9RRQkmhrrZpb/?lang=pt>. Acesso em fev. 2022.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew Science. v. 260, n. 5105, p. 214-216, April, 1993. DOI: 10.1126/science.8097061.

STROBEL G. et al Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products, v. 67, p. 257–258, 2004. DOI <https://doi.org/10.1021/np030397v>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np030397v>. Acesso em 19 abr. 2023.

VALENTE, P. M. S., et al., vincristina: perfil farmacológico. História e perspectiva. Passado, presente e futuro. International Journal of Development Research. v. 12, n. 6, p. 57007-57011, 2022. <https://doi.org/10.37118/ijdr.22748.06.2022>. Disponível em: <https://journalijdr.com/archive/202206>. Acesso em 19 de abr. 2023.

WANG, L.; ZHANG, Y.; HE, H. P.; ZHANG, Q.; LI, S. F.; HAO, X. J. Three new terpenoid indole alkaloids from *Catharanthus roseus*. Planta Medica, v. 77, n. 7, p. 754-758, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1250569. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0030-1250569>.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. Nat.Prod.Rep. v. 23, p. 753– 771, 2006. DOI: 10.1039/b609472b. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2006/np/b609472b>. Acesso em 29 de mai. 2023.