



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFITICOS ISOLADOS DE *Lippia origanoides*

**Humberto Fernandes Nascimento Junior¹; Alexandre Espeleta de Freitas²;
Angelica Maria Lucchese³ e Hianna Almeida Câmara Leite⁴**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

humbertojic@gmail.com

2. Orientador, Departamento de nome, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

espeleta@uefs.br

3. Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos - Lapron, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

angelica.lucchese@gmail.com

4. Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos - Lapron, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

hianna.leite@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: extratos, antioxidantes e antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

Produtos naturais com fins terapêuticos e nutricionais são alvos de pesquisas que buscam encontrar substâncias com propriedades bioativas, provenientes do metabolismo secundário do reino vegetal ou de micro-organismos. Endofíticos ou endófitos são micro-organismos que residem em espaços do tecido intercelular de plantas, podendo ser fungos, bactérias e até mesmo vírus, entretanto fungos são os mais encontrados. Endofíticos podem estar presentes em qualquer momento de suas vidas colonizando alguma região da planta como raiz, caule e folhas (CASSELA, 2014).

A busca por antimicrobianos é uma problemática complexa devido ao longo período de tempo para o desenvolvimento destes produtos, sendo que a resistência a antimicrobianos avança em um espaço de tempo muito inferior em relação ao surgimento de novos antimicrobianos. A importância dos antioxidantes se dá uma vez que doenças surgem devido quantidade excessiva de radicais livres no organismo, e a presença de antioxidantes *in vivo* não é suficiente para impedir o surgimento de tais doenças (DUARTE-ALMEIDA, et al, 2006).

Lippia origanoides Kunth é uma espécie de ocorrência na região do semi-árido que apresenta atividade antimicrobiana, e seus extratos metanólicos inibiram o crescimento de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*

(PINTO et al, 2013, SARRAZIN et al. 2015). O estudo do perfil químico de uma planta pode envolver também o conhecimento da sua microbiota, pois tais atividades podem ser provenientes de substâncias produzidas por micro-organismos e não substâncias consideradas como provenientes do metabolismo secundário da planta (KUSARI et al., 2012 apud CASELLA, 2014). O presente estudo tem como objetivo realizar a avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante da comunidade fúngica endofítica presente nos caules e folhas da *Lippia origanoides*, com o intuito de selecionar os micro-organismos mais promissores para estudos futuros de isolamento de metabólitos ativos. Cabe destacar a importância da descoberta de novas substâncias com ação antimicrobiana, pois é conhecido o problema crescente da resistência de micro-organismos aos medicamentos em uso. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência bacteriana é uma das principais ameaças à saúde humana, pois as bactérias são resistentes à maioria, ou até a todos, os antibióticos disponíveis no momento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE [OMS], 2014).

METODOLOGIA

1. Coleta e Isolamento de Endofíticos

Foram coletadas partes vegetais de diferentes exemplares da espécie *L. origanoides* (LO), sob a supervisão do Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira. Após desinfecção, foram feitos recortes dos órgãos vegetais para crescimento em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e Extrato de Malte Ágar (EMA). A medida que ocorreu crescimento dos endofíticos foi realizado repiques até obter fungos isolados. Após o isolamento dos fungos, a conservação foi feita através do método de Castellani, repiques consecutivos e armazenagem em geladeira. Cada isolado recebeu um código, que representava a planta do qual foi isolado (LO – se referindo a *L. origanoides*), um número se referindo a origem do mesmo (1: origem Milagres-BA; 2: origem Jaguarari/Senhor do Bonfim-BA; 3 origem Santa Bárbara-BA), a letra C para os que foram isolados de caules ou F para os isolados de folhas; seguido do número da placa (sendo de 1 a 3) e o número individual do fungo identificando a ordem em que foi identificado na placa.

2. Obtenção dos Extratos Brutos

Os extratos dos fungos isolados de caule e folha da *L. origanoides* foram obtidos por cultivo em meio sólido Ágar Batata Dextrose (BDA) e Extrato de Malte Ágar (EMA), de acordo ao meio no qual o endófito foi isolado. Após crescimento de 15 dias

em placas de petri, a cultura foi submetida a extração por maceração durante 48 horas, com utilização do acetato de etila como solvente extrator.

3. Triagem da Atividade Biológica

A triagem da atividade antimicrobiana foi feita frente aos patógenos: *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (resistente a meticilina), *Escherichia coli* CCMB261 (resistente a sulfonamida) e *Candida albicans* CCMB286 (resistente a fluconazol e anfotericina B) sendo determinadas através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012a; CLSI, 2008), na concentração de 1 mg/mL. A triagem da atividade antioxidante foi realizada por meio da utilização de solução metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) a 40 ug/mL. A solução foi pulverizada em cromatoplasmas contendo os extratos a serem testados.

4. Triagem da Composição Química

Os extratos foram submetidos à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para determinação do perfil cromatográfico, em eluição com mistura dos solventes hexano e acetona (6:4). As soluções de reveladores utilizados foram: solução de anisaldeído-ácido sulfúrico (AS), solução de NP-PEG, solução de Drangedorff (DRB), hidróxido de potássio (KOH). As cromatoplasmas foram reveladas após obter os extratos separados por CCD em placas de Sílica Gel em alumínio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do isolamento obtido dos três pontos de origem, 1LO (Milagres-BA), 2LO (Jaguarari/Senhor do Bonfim-BA), 3LO (Santa Bárbara-BA), totalizou 71 endofíticos. Foram obtidos extratos em acetato de etila de 36 endofíticos isolados de Batata Dextrose e Ágar (BDA) e Extrato Malte Ágar (EMA). A avaliação da atividade antimicrobiana desses extratos em acetato de etila indicou que 26 extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente ao patógeno *S. aureus* (ATCC43300). Destes 26 extratos, 13 também apresentaram atividade antimicrobiana para a *C. albicans* (CCMB286). Nenhum dos extratos testados apresentou atividade frente a *E. coli* (CCMB261). A diferença dos resultados da ação microbiana dos extratos frente aos patógenos gram-positivos (*S. aureus*) e gram-negativos (*E. coli*), pode ser explicada pelas diferenças morfológicas presentes na estrutura celular, visto que a estrutura de uma bactéria gram-negativa é bem mais complexa do que a de uma gram-positiva, devido a presença da membrana externa que dificulta a ação antimicrobiana (PINTO, 2008).

Todos os extratos brutos que apresentaram atividade antimicrobiana demonstraram também resultado positivo para atividade antioxidante. Os extratos 2LO-C1.1 (Caule/BDA) e 1LO-C2.1 (Folha/BDA) apresentaram apenas resultado positivo para atividade antioxidante. A presença de metabólitos das classes dos terpenos, esteroides e ácidos fenólicos e flavonoides foi detectada em todos os extratos ativos e da classe das cumarinas apenas para 1LO-C3.1 (Caule/BDA). Alguns fungos apresentaram semelhança no perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada e nos testes de triagem da antioxidante e antimicrobiana, sugerindo que podem pertencer ao mesmo gênero ou espécie, sendo eles: 2LO - F1.2, 3LO - F3.1, 2LO - F3.2 (isolados de folha/BDA); 2LO-C1.3, 3LO-C3.2, 3LO-C3.1, 1LO-C3.1 (isolados de caule/BDA) e 1LO - C2.1, 2LO - C3.2 (isolados de caule/EMA).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da microbiota endofítica oriunda de *Lippia origanoides* (71 isolados), 36 foram avaliados frente ao seu potencial biológico e 26 apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, 17 com atividade antifúngica frente a *C. albicans* e 28 com atividade antioxidante, com detecção da presença de compostos fenólicos, terpenos e esteroides em seus extratos. Estudos posteriores dos endofíticos mais promissores devem ser conduzidos para o isolamento dos metabólitos ativos e identificação dos micro-organismos.

REFERÊNCIAS

CASSELLA, T. M. **Substâncias Antimicrobianas ou Citotóxicas em Micro Organismos Endofíticos Foliare**s. Brasília, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília e Universidade das Antilhas e da Guiana. Brasília, 2014.

OLIVEIRA, D.R et al. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Organização Mundial de Saúde [OMS]. Genebra: abr. 2014, p.257. 2014.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med.** v.17, n.1, Botucatu. Jan./Mar, 2015.

PINTO, CRISTIANA DA PURIFICAÇÃO. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL QUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO LIPPIA DO SEMI-ÁRIDO DA BAHIA**. 2008. (Dissertação - Mestrado em Biotecnologia). Bahia, 2008.