

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Lippia origanoides* Kunt. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

**Jade Ribeiro Carneiro¹; Angélica Maria Lucchese²; Joelma de Souza Santos³,
Hianna Almeida Câmara Leite⁴ e Luís Fernando Pascholati Gusmão⁵**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rc.jade@hotmail.com
2. Orientador, Departamento Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anlucc@uefs.br
3. Participante do projeto, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: joelma.farm@hotmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: leite.hianna@gmail.com
5. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia origanoides*; endofíticos; atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo reconhecidas como uma fonte de fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários de importância farmacêutica (HUANG *et al*, 2008). A flora brasileira dispõe de diversas espécies vegetais de aplicação medicinal, a maioria delas de ação ainda pouco caracterizada cientificamente. Tanto estas plantas, como seus endofíticos e os metabólitos produzidos por ambos, carecem de melhor investigação (SHAN *et al*, 2012; SIQUEIRA *et al*, 2011; GONG e GUO, 2009).

O gênero *Lippia*, o maior gênero de Verbenaceae, compreende cerca de 200 espécies, que são frequentemente utilizadas pela medicina popular brasileira (PASCUAL *et al.*, 2001). Dentre elas a espécie *Lippia origanoides* Kunth., que tem um dos seus usos medicinais no tratamento de doenças associadas a microorganismos e os extratos metanólicos de folha e caule apresentam atividade antimicrobiana (PINTO *et al*, 2013).

Considerando a importância medicinal desta espécie e tendo em vista a ampla potencialidade de resultados promissores envolvendo a relação mutualística planta-hospedeiro, este trabalho tem como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana frente à bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (CCMB263 resistente a novobiocina) e à bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (CCMB261 resistente a sulfonamida) e a avaliação do perfil cromatográfico de fungos endofíticos isolados de *Lippia origanoides* Kunth de ocorrência no estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material vegetal

A espécie *Lippia origanoides* foi coletada em campo de cultivo no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) em agosto de 2015.

Isolamento, purificação e identificação da microbiota endofítica fúngica

Para a desinfestação do material vegetal e confirmação da desinfestação utilizou-se a metodologia de Momeso, *et al.* (2008). Dois fragmentos vegetais de folhas ou de caules foram depositados em placas (duplicata) contendo Agar Batata Dextrose (BDA), suplementado com Cloranfenicol [100 mg/ml]. Cada colônia fúngica a iniciar crescimento foi isolada e transferida para nova placa contendo meio BDA para obtenção de culturas puras. Cada isolado recebeu um código e foi preservado. A identificação morfológica dos isolados foi realizada no Laboratório de Micologia LAMIC-UEFS.

Produção dos extratos

Os fungos foram cultivados em meio líquido (Extrato de Malte) em Shaker, a 150 rpm e 30°C, até zerar o nível de glicose. O micélio foi removido por filtração e os metabólitos presentes no meio líquido foram extraídos com acetato de etila. O solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotatório, para obtenção dos extratos secos. Extratos a partir dos meios não fermentados também foram produzidos como controle.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Perfil químico dos extratos

Para a determinação do CIM, foi executada microdiluição em caldo, seguindo as normas da NCCLS. Controles do meio 1x concentrado, 2x concentrado, da água, dos micro-organismos, do DMSO e do antibiótico Cloranfenicol [6 ug/uL] foram feitos. Para revelação, foi utilizado Resazurina 0,01%. A determinação da CBM foi feita após a revelação, 1 uL de cada poço em que não houve crescimento bacteriano foi plaqueado em placas de petri contendo Agar MH. A menor concentração em que não houve crescimento é a CBM. Para avaliar o perfil químico dos extratos e compará-los com a planta, foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica com os reveladores Anisaldeído - Ácido Sulfúrico (AS) para revelação de terpenos e esteroides e Reagente de Produtos naturais (NP/PEG) para revelação de fenólicos e flavonoides (WAGNER E BLADT, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de quinze fungos foi isolado, sendo dez de caule e cinco de folha. Destes, apenas quatro não foram identificados a nível de gênero (tabela 1). Extratos de acetato de etila de todos os isolados foram obtidos e submetidos aos testes de CIM e CBM cujos resultados se encontram na tabela 1. Os fungos três e seis, ambos pertencentes ao gênero *Alternaria*, apresentaram menor de CIM (0,08 mg/mL, com ação bacteriostática nesta concentração) frente ao patógeno *S. aureus*. Já o fungo onze foi o mais ativo frente ao patógeno *E. coli* com CIM de 0,8 mg/mL e ação bacteriostática nesta concentração. Os melhores resultados dos extratos frente a *S. aureus* podem ser explicados pelo fato dessa bactéria ser Gram positiva, com menor complexidade estrutural em sua parede celular, que permite uma maior permeabilidade das substâncias. Cabe destacar que fungo onze não inibiu o crescimento de *S. aureus*, entretanto seu extrato foi o mais ativo para *E. coli*.

Os diferentes resultados encontrados entre os fungos são um reflexo da composição química dos metabólitos secundários produzidos. Os produtos naturais extraídos de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividade biológica, e

podem ser agrupados em várias categorias, dentre elas alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides e lignanas, fenol e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outras (ZHANG et al., 2006). O resultado do CCD dos quinze extratos fúngicos e os extratos da folha e do caule de *Lippia* pode ser observado na figura 1. Todos os extratos apresentaram terpenos e esteróides evidenciados pela coloração rósea, roxas e amareladas (visível) e fluorescência amarelada e azulada (UV 365 nm) (figura 1, a e b) e presença de ácidos fenólicos pela fluorescência azulada e flavonoides com fluorescência amarelada, amarelo-esverdeada ou alaranjada (UV 365 nm) (figura 1, c e d), entretanto em quantidades diferentes. O perfil cromatográfico dos extratos dos fungos três, cinco e seis são bem diferenciados dos outros perfis e apresentam similaridade na composição dos metabólitos e atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, isso pode ser uma característica do gênero *Alternaria* ao qual esses três microorganismos pertencem.

Tabela 1. Resultados do teste de CIM e CBM para os extratos dos fungos endofíticos isolados.

Número	Identificação	S. aureus		E. coli	
		CIM mg/ml	CBM mg/ml	CIM mg/ml	CBM mg/ml
1	<i>Diaporthe</i> sp. (c)	5	5	10	10
2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (c)	5	10	10	10
3	<i>Alternaria</i> sp. (c)	0,08	0,16	5	10
4	<i>Phoma-like</i> (c)	10	10	10	-
5	<i>Alternaria</i> sp. (c)	2,5	2,5	10	-
6	<i>Alternaria</i> sp. (c)	0,08	0,16	5	5
7	Micélio estéril (c)	5	5	5	10
8	<i>Dreschlera</i> sp. (c)	0,625	1,25	5	10
9	<i>Phoma-like</i> (c)	5	10	5	10
10	<i>Fusarium</i> sp. (c)	10	10	10	10
11	Micélio estéril (f)	R	R	0,8	10
12	Ascomiceto com anamorfo				
13	<i>Phoma-like</i> (f)	10	10	10	10
14	Ascomiceto (f)	5	10	5	10
15	Micélio estéril (f)	1,25	5	2,5	5
16	<i>Myrmecridium schulzeri</i> (f)	10	10	10	10
17	Caule	2,5	2,5	10	10
	Folha	2,5	2,5	10	10

Legenda: (c) corresponde a isolamento do caule e (f) isolamento da folha. A concentração inicial para todos os extratos foi de 10mg/ml. R – resistente: Não inibiu o crescimento bacteriano até a maior concentração testada. (-) indica que não houve ação bactericida, apenas bacteriostática.

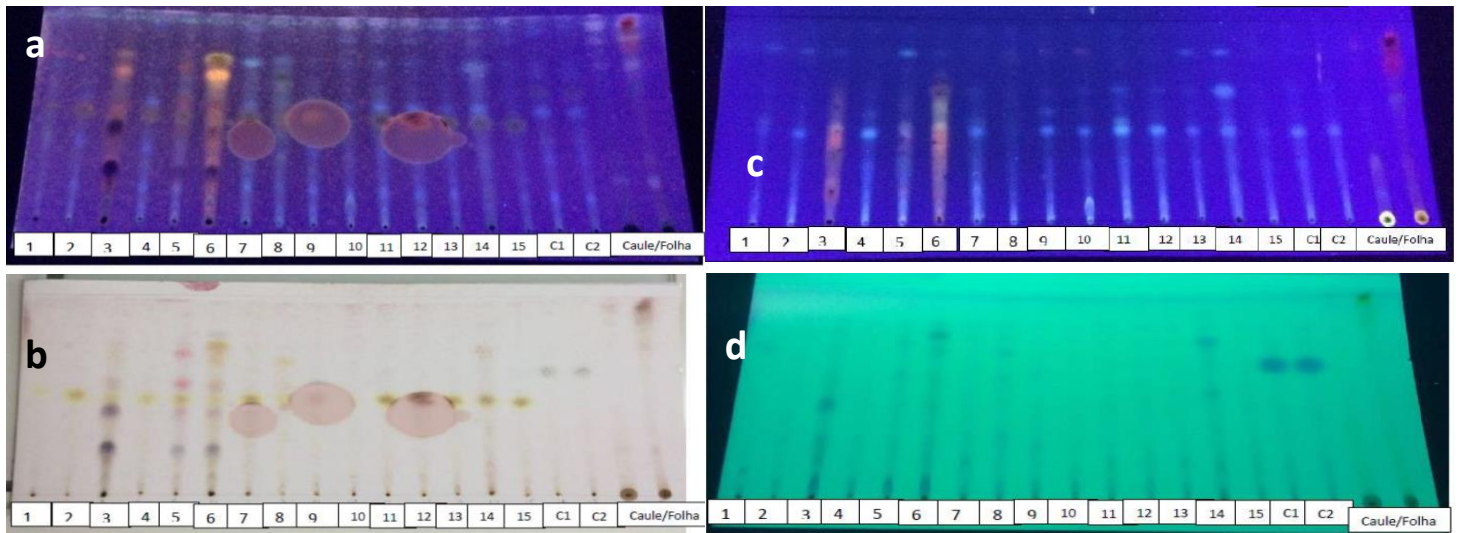


Figura 1. Cromatografia em Camada Delgada dos extratos dos fungos isolados e extratos do caule e da folha de *Lippia origanoide.s* a) CCD revelada com AS na luz UV365nm, b) CCD revelada com AS na luz visível, c) CCD revelada com NP/PEG na luz UV365nm e d) CCD revelada com NP/PEG na luz germicida. Os números dos extratos correspondem aos números dos fungos da tabela 1. Proporção dos solventes: hexano acetona (1:1).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos endofíticos três e seis (*Alternaria* sp), oito (*Dreschlera* sp) e onze (não identificado) se revelaram fontes promissoras de metabólitos secundários ativos. Futuros trabalhos serão necessários para isolamento e identificação desses compostos.

REFERÊNCIAS

- GONG, L.; GUO, S. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*. 8(5).
- HUANG, W.Y., CAI, Y.Z. and HYDE, K.D., CORKE, H.; SUN, M.(2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.
- MOMESSO, L. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; NOMIZO, A.; GOLDMAN, G. H.; PUPO, M. T. 2008. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado à *Vigueira robusta* (Asteraceae). *Química Nova*.
- PASCUAL, M.E. et al. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 201-214.
- PINTO, C. P. et al. 2013. Antimicrobial Activity of *Lippia* Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 6.
- SHAN, T. et al. 2012. Antibacterial activity of the endophytic fungi from medicinal herb, *Macleaya cordata*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11(19): 4354-4359.
- SIQUEIRA, V. M., CONTI, R., DE ARAÚJO, J. M., SOUZA-MOTTA, C. M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*. 53(2): 89-95.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 2001. *Plant Drug Analysis, a thin layer chromatography atlas*. Springer. Second edition.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*. 23(5): 753-771.