



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA COMBRETACEAE DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Camila Cristiane **Pansa**<sup>1a</sup>; Itamar Soares **Melo**<sup>2b</sup>; Suikinai Nobre **Santos**<sup>3c</sup>

<sup>1</sup> FHO Uniaras, Araras/SP; <sup>2</sup> Embrapa Meio Ambiente/SP; <sup>3</sup> Embrapa Meio Ambiente/SP

**Nº 13414**

**RESUMO** – O bioma semiárido do Brasil, a caatinga, possui condições extremas que favorecem a adaptação a temperaturas e escassez hídrica. Muitas plantas da família combretaceae estão adaptadas a essas condições, e em relação simbiótica com essas plantas vivem fungos endofíticos também adaptados a essas condições. Visando avaliar o potencial para produção de substâncias antimicrobianas, de amostras obtidas da família combretaceae no semiárido do Brasil, foram isolados 32 linhagens de fungos, das quais foram provenientes de diferentes partes amostradas, sendo 80% das colônias de fragmentos foliares, 20% de fragmentos caulinares. Os fungos isolados foram testados com seis microrganismos, Staphylococcus equis CCMA1189, Bacillus coagulans CCMA183, Acromobacter xylosoxidans CCMA561, Bacillus equis e uma linhagem fúngica fitopatogênica Pythium aphanidermatum CCMA 243 e Candida sp. CCMA 224. 16% dos extratos apresentaram atividade antifúngica contra o fungo filamentoso fitopatogênico P. aphanidermatum e apenas um extrato apresentou atividade contra linhagem leveduriforme Candida sp.. Para as linhagens bacterianas patogênicas humanas, apenas Staphylococcus equis foi sensível 21% dos extratos testados.

**Palavras-chaves:** Caatinga, *Combretum leprosum*, fungos endofíticos, atividade antimicrobiana.

<sup>a</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, camilacristiane.p@hotmail.com, <sup>b</sup> Orientador: Pesquisador, <sup>c</sup> Colaboradora: Pós-Doutoranda

**ABSTRACT-** The semi-arid biome of Brazil, Caatinga, has extreme conditions for adaptation to high temperatures and water scarcity. Many family combretaceae plants are adapted to these



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

*conditions, and symbiotic relationship with these plants live endophytic fungi also adapted to these conditions. To evaluate the potential for production of antimicrobial substances in samples obtained family combretaceae in semiarid Brazil, were isolated 32 strains of fungi, which were sampled from different parties, with 80% of colonies of leaf fragments, 20% of fragments stem. The isolates were tested with six microorganisms, Staphylococcus equis CCMA1189, Bacillus coagulans CCMA183, Acromobacter xylooxidans CCMA561, Bacillus equis e uma linhagens fúngicas fitopatogênicas Pythium aphanidermatum CCMA 243 e Candida sp., CCMA 224. 16% dos extratos apresentaram atividade antifúngica contra o fungo filamentoso fitopatogênico P. aphanidermatum e apenas um extrato apresentou atividade contra linhagem leveduriforme Candida sp.. Para as linhagens bacterianas patogênicas humanas, apenas Staphylococcus equis foi sensível 21% dos extratos testados.*

**Key-words:** Caatinga, *Combretum leprosum*, endophytic fungal, antimicrobial activity.

### 1 INTRODUÇÃO

A região semiárida do Nordeste do Brasil ocupa uma área de 844.453 km<sup>2</sup> (10% do território nacional) (Brasil, 2010). É considerado um bioma com grande déficit hídrico, cujas plantas que vivem neste local possuem grande potencial de adaptação, pois estão expostas a escassez hídrica e temperaturas elevadas.

Plantas do gênero *Combretum leprosum*, podem ser encontradas em cinco estados da região de Semiárido (Bahia, Piauí, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte). (Santos et al., 2012). Nessas plantas são encontradas uma grande variedade de microrganismos, que são de grande interesse para a Ciência. Os micro-organismos endofíticos, tais como os fungos, podem colonizar folhas, ramos e raízes, sem causar prejuízos aos hospedeiros, habitando de forma sistêmica o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos o interior da célula. Dessa relação simbiótica, os fungos podem desempenhar funções relevantes para sanidade vegetal, protegendo as plantas contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, resistência a estresses, além de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos (Peixoto Neto et al., 2002).

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (FAHEY, et al., 1988;), como agentes inibidores de pragas e patógenos, e também como



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

fontes de metabólitos primários (STAMFORD et al., 1998) e secundários. Nas últimas décadas, a comunidade científica vem pesquisando dentro da área da química, farmacologia e microbiologia, compostos para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL et al., 2002; SOUZA et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos obtidos de fungos endofíticos isolados de planta da família Combretaceae do semiárido brasileiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de coleta

Os locais de coleta de plantas da espécie vegetal *Combretum leprosum*, foi delimitado pela região de caatinga do semiárido nordestino, nos estados de Bahia e Piauí. Nestas áreas foram coletadas partes das plantas (caule e folhas) segundo os padrões internacionais de coleta incluindo as coordenadas geográficas. A identificação das espécies botânicas foi realizada no Herbário da Embrapa Semiárido, uma exsicata encontra-se depositada neste herbário. As coletas foram realizadas durante o período de chuva (em função do estado fenológico da espécie da planta incluído a coleta de flores, frutos e sementes, quando presentes). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e submetidas a vácuo e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, onde foi realizado o isolamento dos micro-organismos endofíticos.

### 2.2 Isolamento e preservação dos micro-organismos endofíticos

Os materiais botânicos coletados foram processados imediatamente após a coleta para isolamento de micro-organismos endofíticos. Para desinfecção superficial e retirada de possíveis micro-organismos epifíticos das amostras coletadas, as folhas, caules e raízes foram lavados com água destilada e detergente. Em seguida, em câmara asséptica, foram submetidos a uma sequência de desinfecção em álcool a 70% (5 min para folhas e 10 min para caule e raiz) e hipoclorito (NaClO) 3% (3 min para folhas e 5 min para caule e raiz). Após a assepsia, foram cortados fragmentos de 8 a 12 cm e plaqueados em placas de Petri em meio de cultura agar batata dextrose (BDA), meio de Martin, agar água (AA) para isolamento de fungos (ARAUJO, 2001), como representado na figura 5.1. Como controle de efetividade do processo de desinfecção, foram realizados controles com alíquotas de 0,1mL da última água destilada esterilizada (última etapa do processo) em BDA. Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e para cada planta, foram feitas



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

três placas de cada meio de cultura, cada um com sete pedaços do tecido vegetal. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por um período de 60 dias. (COLLADO et al., 1996)

Após o crescimento das hifas dos fungos endofíticos nas extremidades dos fragmentos, foram realizados repiques de todos os isolados para novas placas de BDA. Após purificação, as culturas foram incubadas por 15 dias a 28°C para crescimento.



Figura 1 - Esquema com as etapas do isolamento dos micro-organismos endofíticos

Para preservação dos isolados, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro de todos os isolados foram submersos em 5 mL de água destilada em frascos lacrados, à temperatura ambiente e em triplicata e depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Empresa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP/Brasil.

### 2.3 Obtenção dos metabólitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos dos isolados endofíticos

Como ponto inicial para avaliação do potencial biológico dos endofíticos isolados foram obtidos extratos brutos em pequena escala e para avaliação do potencial de suas biomoléculas na determinação da atividade antimicrobiana para diversos micro-organismos testes. As linhagens foram inoculadas em 200 mL de caldo Czapek (Himedia, Índia), incubada a 28°C, por 15 dias, com ausência de agitação. Após o crescimento fúngico, os caldos de culturas foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45 µm (Milipore), e centrifugação a 9000 rpm por 30 min a 4°C para retirada das células fúngicas. Os filtrados foram submetidos, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases (SDF), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1 (v/v) em múltiplos pHs (ácido 3,0; básico 11,0) onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionada à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 45°C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). Os extratos brutos obtidos foram pesados em balança



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

analítica e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O extrato bruto seco do controle negativo foi obtido por meio da extração do caldo de cultura sem inóculo.

### 2.4 Avaliação do potencial antimicrobiano

#### 2.4.1 Os micro-organismos testes:

Os microrganismos testados foram linhagens bacterianas patogênicas humanas: *Staphylococcus equis* CCMA1189, *Bacillus coagulans* CCMA183, *Acromobacter xylosoxidans* CCMA561, *Bacillus equis* e uma linhagens fúngicas fiopatogênicas *Pythium aphanidermatum* CCMA 243 e *Candida* sp. CCMA 224. Os microorganismos testes foram obtidos a partir da coleção de cultura de micro-organismos do laboratório de microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente Jaguariúna, São Paulo, Brasil. Todas as linhagens bacterianas e fúngicas cresceram em meio de cultura respectivamente em agar nutriente (NA) e Agar dextrose batata (BDA), a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24h para linhagens bacterianas e até 4 dias para linhagens fúngicas.

#### 2.4.2 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia de Bauer et al. (1960) com adaptações. Com auxílio de uma alça bacteriológica foram colhidas colônias bacterianas isoladas e ressuspensa em solução salina a 0,85%, a fim de se obter uma turvação correspondente com a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para tanto, foi utilizado um aparelho espectrofotométrico (A-Just TM- Abbot, Chicago, EUA) em absorvância de 625nm. Após a homogeneização do inóculo foram retiradas 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana, plaqueadas em NA e semeadas com auxílio de um *swab* estéril. Para as linhagens fúngicas foram repicado parte do micélio com diâmetro de 5 mm e com auxílio de uma pinça estéril foram colocados no centro de placas com meio BDA. Em discos de papel estéreis foram impregnados 5  $\mu\text{L}$  da suspensão dos extratos brutos ressuspensidos em DMSO (dimetilsulfoxido) a aplicação destes foi efetuada com auxílio de pinça estéril para evitar contaminação. Após o período de incubação, foi realizada a leitura com o auxílio de um halômetro, utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco dos halos de inibição.

## 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Um total de 32 isolados fúngicos foram obtidos dos órgãos vegetais de *C. leprosum* coletados na caatinga do semiárido brasileiro. As linhagens foram provenientes de diferentes



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

partes amostradas, sendo 80% das colônias de fragmentos foliares, 20% de fragmentos caulinares, tabela 1. Além disso, as linhagens isoladas neste trabalho não representam a diversidade total de fungos endofíticos de *C. leprosum*, principalmente devido à seleção de linhagens capazes de crescer nos meios de cultivos utilizados. Os isolados obtidos neste estudo representam uma amostra da diversidade total dos endofíticos associados ao *C. leprosum*, uma vez que o isolamento é limitado por meio das técnicas tradicionais de cultivo e representa menos de 5% da diversidade total associada, quando comparados com estudo de diversidade dos microrganismos não cultiváveis obtidos por ferramentas de bioinformática e biologia molecular (OLIVEIRA, 2006; SETTE, GARBOGGINI et al., 2006).

Tabela 1. Linhagens fúngica endofíticas isoladas de órgãos vegetais do *Combretum leprosum*, planta coleta no semiárido brasileiro.

Identificação	Origem	Órgão da planta	Atividade antimicrobiana		
			<i>Phytium aphanidermatum</i>	<i>Staphylococcus equis</i>	<i>Candida sp</i>
F05	<i>C. leprosum</i>	Folha	(+)	(-)	(-)
F06	<i>C. leprosum</i>	Folha	(++)	(-)	(-)
F07	<i>C. leprosum</i>	Folha	(+)	(-)	(-)
F11	<i>C. leprosum</i>	Folha	(+++)	(-)	(-)
F12	<i>C. leprosum</i>	Folha	(++)	25 mm	(-)
F14	<i>C. leprosum</i>	Folha	(-)	14 mm	(-)
F20	<i>C. leprosum</i>	Galho	(-)	12mm	(-)
F21	<i>C. leprosum</i>	Galho	(-)	12 mm	(-)
F23	<i>C. leprosum</i>	Galho	(-)	11 mm	(-)
F24	<i>C. leprosum</i>	Folha	(-)	11 mm	(-)
F27	<i>C. leprosum</i>	Folha	(-)	30 mm	12 mm

(+) atividade moderada; (++) média atividade; (+++) forte atividade inibitória; (-) ausência de atividade inibitória}

De acordo com atividades antimicrobianas dos extratos dos isolados fúngicos endofíticos de *C. leprosum*, os compostos apresentaram potencial atividade antimicrobiana contra os microorganismos teste neste estudo. Os extratos avaliados, 16% apresentaram atividade antifúngica contra o fungo filamentoso fitopatogênico *P. aphanidermatum* e apenas um extrato apresentou atividade contra linhagem leveduriforme *Candida sp.*. Para as linhagens bacterianas patogênicas humanas, apenas *Staphylococcus equis* foi sensível 21% extratos testados. Os compostos produzidos pela linhagem F11, isoladas de folhas de *C. leprosum*, foram os mais ativos contra o *P.*



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

*aphanidermatum*, mas não apresentou atividade para *S. equis* e para *Candida* sp., pois certamente utiliza mecanismo de ação modelado para filamentosos. Os extratos das linhagens F14, F20, F21, F23 e F24, apresentaram atividade exclusivamente para bactéria, com halo de inibição com diâmetros entre 11 a 25 mm, variando atividade de fraca a forte inibição. Contudo, os compostos presentes no extrato da linhagem F27 apresentou fortes atividades com o maior halo de inibição observado em todo experimento, de 30 mm, além disso, foi o único que conseguiu apresentar algum tipo de inibição contra *Candida* sp.. Os extratos não apresentaram nenhuma atividade contra as linhagens bacterianas *Bacillus coagulases*, *acromobacter xylosoxidans* e *Bacillus equis*.

De acordo com os dados obtidos, a técnica de obtenção de produtos do metabolismo secundário dos microrganismos utilizado neste estudo, foi eficiente para a obtenção de compostos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, uma vez que foram inibidos microrganismos de eucariotos e procaríotos. Trabalhos com endófitos de plantas do gênero *Combretum* revelam composto com grande potencial para biomoléculas e moléculas ativas com atividades antimicrobianas, antioxidante, antimicobacteriana e anticancerígenas (Santos et al., 2012, Santos et al., 2013), considerando fonte de bioprospecção para uso na agricultura e biotecnológica e áreas afins.

#### 4 CONCLUSÃO

O estresse ambiental que as plantas e microorganismos estão submetidas pode induzir o desenvolvimento de mecanismos de resistência e adaptação, e com a devida pesquisa avaliou-se que as linhagens isoladas de *Combretum leprosum*, F05, F06, F07, F11 e F12 foram as únicas a inibirem *P.aphanidermatum* e as linhagens F14, F20, F21, F23, F24 e F27, foram as únicas a inibirem *Staphylococcus equis*. De todas essas linhagens apenas a F27 inibiu a *cândida* sp, e apenas a F11 obteve mais atividade para *P. aphanidermatum*. Portanto plantas do gênero *Combretum* revelam compostos com grande potencial para a biotecnologia.

#### 5 AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Meio Ambiente (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), pelo suporte e estrutura para realização dos experimentos e ao CNPq apoio com a bolsa de iniciação científica.

#### 6 REFERÊNCIAS



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ARAÚJO, J. V. **Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Floresta Brasil em resumo [2010]**. Brasília, 2010. 43p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/portallbio>>. Acesso em: 02 ago. 2013b.

Collado, J., Platas, G. and Peláez, F. (1996). **Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain.** Nova Hedwigia 63: 347-360.

FAHEY, J. W. 1988. **Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants.** In: Cutler, H. O. (Ed.) *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture.* American Chemical Society Symposium Ser, Washington. p.120-128.

KILIKIAN, B.V., PESSOA JR. A. **Purificação de produtos biotecnológicos.** In: SCHMIDEL W. et al. *Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.* 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 21. p. 493-521.

OLIVEIRA, V. M. de, SETTE, L.D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e prospecção de recursos microbianos.** MultiCiência, São Carlos, n. 7, out. 2006.

PEIXOTO NETO, P.A. de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. de. **Microrganismos endofíticos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.29, p.62-77, 2002.

SANTOS, S.N.; FERRARIS, F. K.; SOUZA, A. O.; HENRIQUE, M. G.; MELO, I. S. **Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potencial anticancer and antifungal activity.** Int Springer Science+Business Media Dordrecht 2012.

SANTOS S.N.; KAVAMURA V. N.; CASTANHA R. F.; ANDREOTE F. D.; CARVALHO J. E.; QUEIROZ S. C. N.; MELO I. S.; **Antitumoral, Antioxidant And Antimicrobial Molecules From *Combretum Rupicola*.** Int J Pharm Bio Sci 2013 Jan: 4(1): (B) 422-428.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. 1998. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban).** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18(4): 382-385.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos.** In: BRESOLIN, T.M.B; CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.* Itajaí: Ed. Univali; 2003, p.239.