



Detecção de compostos voláteis com atividade antibacteriana por fungos endofíticos associados à *Costus spiralis*

Deyze Alencar SOARES^[1;*], Poliana Guerino Marson ASCENCIO^[1], Geovanka Marcelle Aguiar LEÃO^[1], Katarina Mirna Tenório Marinho RODRIGUES^[1], Raphael Sanzio PIMENTA^[1]

^[1] Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. Email: deyzeas@gmail.com; polianamarson@mail.uft.edu.br; geovankamarcelle@hotmail.com; katmimatr@gmail.com; biorapha@yahoo.com.br

INFORMAÇÕES	RESUMO
Recebido em: 02/09/2015	Fungos endofíticos habitam o interior das plantas sem causar-lhe danos, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Os pressupostos da interação endófito-planta hospedeira sugerem que as propriedades terapêuticas podem estar no fungo e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos; por isso é crescente o interesse por endófitos de plantas medicinais. A bactéria gram-positiva <i>Streptococcus pneumoniae</i> e a gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> são bactérias patogênicas importantes, já que atuam como agentes de infecções, incluindo doenças respiratórias e infecções hospitalares. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de compostos voláteis de fungos endofíticos isolados da planta medicinal <i>Costus spiralis</i> (jacq) Roscoe (Costaceae) e a avaliação antibacteriana dos mesmos contra <i>S. pneumoniae</i> e <i>K. pneumoniae</i> . O teste de verificação de substâncias voláteis foi realizado utilizando placas de Petri com remoção da faixa do ágar da porção central, a fim de evitar o efeito de difusão. Foi inoculado, em lados opostos da placa, o endofítico e o patógeno e as placas foram seladas com parafilme. Os controles negativos foram realizados com a inoculação de cada patógeno no meio de cultura sem o antagonista, sendo que não foi constatada a inibição do crescimento dos patógenos incubados na presença do endofítico teste, comparando-se com o controle. Desse modo, a descoberta de novos antibióticos se faz importante devido o aparecimento de patógenos resistentes, bem como a evolução de novas doenças e a toxicidade de medicamentos que já existem.
Aceito em: 20/11/2015	
Publicado em: 23/12/2015	
Document Object Identifier	
10.18067/jbfs.v2i4.60	
Termos de indexação:	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
planta medicinal	
*Autor para correspondência	
deyzeas@gmail.com	

Volatile compounds detection with antibacterial activity in endophytic fungi associated with *Costus spiralis*

ABSTRACT- Endophytic fungi that live inside plants, for instance, in organs and plant tissues such as leaves and branches, without causing any harm. Assumptions of interactions between endophytic fungi and host plants suggest that therapeutic properties may be in the fungi and not on the plant or, probably, in the interaction amid them. Due to this, the interest in endophytic fungi from medicinal plants has increased. The gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and gram-negative *Klebsiella pneumoniae* are important pathogenic bacteria, acting as infectious agents and causing respiratory diseases and hospital infections. This study aimed to obtain volatile compounds from endophytic fungi, which were isolated from medicinal plant *Costus spiralis* (jacq) Roscoe (Costaceae) and perform an antibacterial evaluation of them against *S. pneumoniae* and *K. pneumoniae*. The test to verify volatile substances was realized using Petri dishes without agar in the central portion, in order to prevent the diffusion effect. The endophytic fungus and the pathogen were inoculated on opposite sides of the plate that were sealed with parafilm. Negative controls were performed with each pathogen inoculation in culture media without antagonist, however, there was no growth inhibition of pathogens for those which were incubated in the presence of endophytic test, when comparing to control test. Thus, the discovery of new antibiotics becomes important due to the emergence of resistant pathogens, as well as the development of new diseases and the toxicity of drugs that already exist.

Index terms: *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, medicinal plant



Copyright: © 2015 JBFS all rights. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Financiamento: Os autores reportam que houve suporte e auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Como referir esse documento (ABNT):

SOARES, D. A.; ASCENCIO, P. G. M.; LEÃO, G. M. A.; RODRIGUES, K. M. T. M.; PIMENTA, R. S. Detecção de compostos voláteis com atividade antibacteriana por fungos endofíticos associados à *Costus spiralis*. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.4, p.156-159, out./dez., 2015. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v2i4.60>

INTRODUÇÃO

Atualmente, a pesquisa de compostos bioativos naturais com aplicação no tratamento e prevenção de doenças humanas tem vindo a ganhar cada vez mais importância [1]. Alguns destes estudos centram-se na bioprospecção de produtos naturais de origem microbiana, tendo sido já descritos neste âmbito mais de 22.000 metabolitos secundários bioativos [2]. Dentre os microrganismos com maior importância como fonte de produtos naturais destacam-se os fungos, sendo responsáveis por 38% do total dos compostos biologicamente ativos de origem microbiana descritos [2]. A maioria destes metabolitos é explorada pela sua atividade como antibióticos, imunossuppressores e antineoplásicos [3]. Dos fármacos mais conhecidos e derivados de fungos destacam-se os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossuppressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros [4].

Apesar dos fungos serem reconhecidos como uma importante fonte de produtos bioativos naturais é estimada que, uma grande quantidade destes compostos, se encontre ainda por identificar [5]. Desta forma, estudos que visem à avaliação da diversidade fúngica em diversos ecossistemas e a bioprospecção de novos produtos naturais resultantes do seu metabolismo, contribuirão para a obtenção de novos fármacos. Nestes estudos de bioprospecção de compostos bioativos naturais deve ser dada especial atenção aos deve ser dada especial atenção aos fungos que estabelecem associação mutualista com as plantas. Durante o estabelecimento destas associações são induzidas vias biossintéticas específicas que produzem novos e diversos metabolitos secundários [6], dependendo de fatores bióticos (e.g. espécies envolvidas na interação) e abióticos (e.g. fatores climáticos) [7]. Os fungos endofíticos são organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem aparentemente causarem quaisquer danos no hospedeiro [8]. Nos últimos anos, estes fungos têm sido alvo de estudos com vista à identificação de novos produtos bioativos naturais que possam ser utilizados para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica de produtos bioativos obtidos desses microrganismos, como é o caso dos antibióticos utilizados no tratamento de infeções em humanos [9-11], mas também alimentar e agrícola [12].

As plantas medicinais são fontes de diversas substâncias com potencial terapêutico. O uso popular de plantas medicinais é extremamente amplo, sendo bem reconhecidas suas atividades estimulantes, antidepressiva, anti-hipertensiva, calmante, sedativa, anti-inflamatória entre outras

[13, 14]. A ampla atividade das plantas medicinais deve-se aos diferentes tipos de metabolitos secundários biossintetizados. A prospecção e o estudo de plantas medicinais de uso popular no tratamento de processos inflamatórios podem nos levar a descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios com maiores eficácia e segurança que os de uso corrente.

Dentre as inúmeras plantas utilizadas tradicionalmente no tratamento de afecções urinárias, cálculo renal, no processo de cicatrização, perda do excesso de líquido no corpo, controle da diabetes, dentre outras [15-17] encontramos a *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe que ocorre na América do Sul tropical em florestas chuvosas, savanas, ou em afloramentos graníticos [18]. Esta espécie denominada popularmente de cana do brejo tem sido usada na medicina popular brasileira. Alguns estudos têm confirmado estas propriedades medicinais [19-21], evidenciando a importância do conhecimento de sua biologia reprodutiva para sua conservação e manejo.

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem substâncias de grande relevância capazes de inibir ou matar uma variedade de agentes causadores de doenças, bem como bactérias e fungos que afetam a população humana, os animais e as plantas [22]. Estas substâncias, por sua vez, podem ser altamente tóxicas, como as micotoxinas, ou ser bastante úteis por serem utilizadas como fármacos para tratamento de várias patologias.

A utilização de fungos endofíticos como produtor de compostos voláteis bioativos, demonstrou ser promissora ao combate de uma ampla gama de patógenos fúngicos e bacterianos de plantas e humanos [23, 24]. Tendo em vista que as plantas medicinais com ação antimicrobiana podem ser hospedeiras de endofíticos com tais propriedades [25], o presente trabalho tem como objetivos verificar a composição dos fungos endofíticos associados à planta medicinal *Costus spiralis*, apresenta atividade antibacteriana contra as bactérias de importância médica *Streptococcus pneumoniae* (Gram positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativa) que são as causas mais comuns pneumonia bacteriana. Ou seja, detectar fungos produtores de compostos voláteis com potencial antibacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Reativação de fungos endofíticos

Inicialmente foi realizada a reativação de fungos endofíticos associados à "*Costus spiralis*"

(jacq) Roscoe (Costaceae) obtidos na Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa.

b) Reativação de patógenos

As bactérias *Kebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) foram reativadas e utilizadas como microorganismos-alvo na triagem de fungos endofíticos para a produção de substâncias inibidoras. Os isolados foram armazenados em 15% de glicerol a -80°C.

c) Teste Antagonista

Os fungos endofíticos serão testados quanto à produção de substâncias voláteis contra os patógenos: *Kebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619). Os isolados endofíticos foram previamente cultivados em Ágar Batata Dextrose (BDA) durante sete dias. O teste de verificação de substâncias voláteis foi realizado utilizando placas de Petri com remoção da faixa de ágar na porção central, a fim de evitar o efeito de difusão. Foi inoculado, em lados opostos da placa, o endofítico e o patógeno (grau de turbidez de 0,5 de acordo da escala de Mac farland) e as placas foram seladas com parafilme. Os controles negativos foram realizados com a inoculação de cada patógeno no meio de cultura sem o antagonista, sendo que a inibição do crescimento foi constatada quantificando-se colônias formadas do patógeno incubado na presença do endofítico teste, comparando-se com o controle.

Todos os testes foram realizados em triplicata e foram considerados ativos os fungos endofíticos que inibiram o crescimento de pelo menos um dos patógenos-alvo. As leituras foram realizadas mensurando as unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias testadas com 24 horas de crescimento. As medidas obtidas foram avaliadas estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico SAS [26].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos 281 isolados testados não foi constatada a inibição dos patógenos testes,

comparando-se com o controle. Os estudos de antagonismo por compostos voláteis (COV) não é tão frequente na literatura quando comparado aos testes de metabólitos difusíveis [27, 28].

O Fungo *Muscodor albus* é comumente citado como o mais promissor produtor de compostos voláteis. Este xilareáceo foi isolado de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e foi letal para certos fungos e bactérias pela produção dessas substâncias. A análise dos compostos voláteis através de cromatografia gasosa identificou este endofítico produz 25 compostos voláteis diferentes [3].

CONCLUSÃO

O percentual de elevado fungos endofíticos produtores de compostos voláteis com atividade antimicrobiana isolados de plantas medicinais, podem ser associados a outros patógenos bacterianos humanos em estudos futuros visando identificar promissores compostos com potencial biotecnológico. Neste contexto, os endofíticos são fontes naturais de crescente interesse industrial e acadêmico para a busca de substâncias bioativas, por serem organismos que podem oferecer oportunidades de inovação na descoberta de novos agentes terapêuticos.

AGRADECIMENTOS

À Cristiane Martins Coelho e Marcia Regina Oliveira Marson por colaborações pessoais, e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por apoio financeiro.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

1. Condução e contribuição na elaboração do artigo:
[Deyze Alencar Soares](#)
[Dr.^a Poliana Guerino Marson Ascencio](#)
[Geovanka Marcelle Aguiar Leão](#)
[Katarina Mirna Marinho Tenório Rodrigues](#)
2. Planejamento, orientação e revisão final do artigo:
[Dr. Raphael Sanzio Pimenta](#)

REFERÊNCIAS

- [1]. DONADIO, S.; MAFFIOLI, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; JABES, D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **The Journal of antibiotics**, v.63, N.8, p.423-430, 2010.
- [2]. BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. **Journal of Antibiotics**. v.58, p.1-26, 2005.

- [3]. STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.
- [4]. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug led. **Pure and Applied Chemistry**. v.77, n. 1, p 7-24, 2005.
- [5]. HIGGINBOTHAM, S.J.; ARNOLD, A. E.; IBANEZ, A.; SPADAFORA, C.; COLEY, P.D.; KURSAR, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophytes taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PloS One**, v.8, n.9, p. 73192, 2013.
- [6]. CARTER, G. T. Natural products and Pharma: Strategic changes spur new opportunities. **Natural product reports**, v.28, n.11, p.1783-1789, 2011.
- [7]. SOLIMAN, S. S.; RAIZADA, M. N. Interactions between co-habitating fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. **Frontiers in microbiology**, v.4, p.1-12, 2013.
- [8]. HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v.33, p.163-173, 2008.
- [9]. STIERLE, A.; STROBEL, G.A.; STIERLE, D.; GROTHANS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v.58, p.1315-1324. 1995.
- [10]. LIANG, Y. Production liquid transportation fuels from heterotropic microalgae. **Applied Energy**, v.104, p. 860-868, 2013.
- [11]. QUADRI, M.; JOHRI, S.; SHAH, B.A.; KHAJURIA, A.; SIDIQ, T.; LATTOO, S.K.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. **Springer Plus**, v.2, n.1, 2013.
- [12]. PORRAS-ALFARRO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review Phytopathology**. v.49, p.291-315, 2011.
- [13]. BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p.408-420, 2006.
- [14]. OBUTE, G. C.; ADUBOR, G. O. Chemicals detected in plants used for folk medicine in south eastern Nigeria, **Ethnobotanical Leaflets**, v.11, n.1, p.173-194 2007
- [15]. ALBUQUERQUE, J.M. Plantas medicinais de uso popular. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS). Ministério da Agricultura – Secretaria Geral. Brasília. 1989.
- [16]. MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas Mediciniais. Editora UFV, Viçosa, 2003.
- [17]. MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P.; Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva do Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.18, p.391-399, 2004
- [18]. MAAS, P.J.M. Costoidae (Zingiberaceae). Flora Neotropica, Monograph, (8), 1972. OBUTE, C. G.; ADUBOR, G. O. Chemicals Detected in Plants Used For Folk Medicine in South Eastern Nigeria. **Ethnobotanical Leaflets**, v.11, p.173-194, 2007.
- [19]. VIEL, T.A.; DOMINGOS, D.C.; SILVA, A.P.M.; LIMALANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.193-198, 1999.
- [20]. ANTUNES, A.S.; SILVA, B.P; PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. **Fitoterapia**, v.71, p.507-510, 2000.
- [21]. SILVA, B.P; PARENTE J.P. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis*. Zeitschrift fur Naturforschung, Section C: **Journal of Biosciences**, v.59, p.81-85, 2004.
- [22]. DEMAİN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.52, p.455-463, 1999.
- [23]. STROBEL, G.A. Rainforest endophytic and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.315-333, 2002.
- [24]. WORAPONG, J; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; LI, J. Y.; BAIRD, G; HESS, W. M. *Muscodor albus* anam. nov. na endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, v.79, p.67-79, 2011.
- [25]. KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v.71, p.159-162, 2008.
- [26]. SAS. Statistical Analysis System. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001.
- [27]. CHAURAUSIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.S.; TRIVEDIP, I.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, v.160, p.75-81, 2005.
- [28]. PIMENTA, R. S.; SILVA, J. F. M. ; BUYER, J. S. AND JANIEWICZ, W. J. Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against Monilinia. **Journal of Food Protection**, v.75, n.10, p.1883-1889, 2012.