

74881 - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIBIÓTICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA PELO FUNGO CDSA71

Felipe Ravelly Alves de Souza¹; Catarina Buson de Oliveira Muniz²; Caio de Azevedo Lima²; Elder Miguel Esperidião Silva Borges²; Laedson Enéas Cavalcante²; Laura Araujo da Silva Amorim²; Jean César Farias de Queiroz³.

¹Graduando em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – CDSA. Universidade Federal de Campina Grande – UFCG; Rua Barata Bezerra – 438, Alto Alegre, Sumé-PB (58540-000). feliperavelly_mh@hotmail.com; ²Graduando em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, UFCG, CDSA; ³Doutor em Biotecnologia. Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, CDSA, UFCG.

RESUMO: O surgimento de bactérias cada vez mais resistentes a medicamentos leva à constante prospecção e produção de fármacos mais eficazes, de amplo espectro, baixa toxicidade e alta especificidade. O objetivo do trabalho em questão foi avaliar a produção dos antibióticos a partir de processo fermentativo em meio semissólido, utilizando fungos filamentosos encontrados no Bioma Caatinga, microrregião do Cariri paraibano. O fungo empregado no experimento pertence ao gênero *Aspergillus*, nomeado CDSA71, obtido na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia do CDSA - UFCG, Sumé. O microrganismo foi inoculado em meio de aveia e após seu crescimento realizou-se a extração de seus metabólitos por meio de solventes. Em seguida os metabólitos foram testados por meio do antibiograma para a verificação da atividade antimicrobiana. Os fungos foram avaliados quanto ao seu potencial em produzir compostos antimicrobianos contra bactérias Gram negativa (*Escherichia coli*) e Gram positiva (*Staphylococcus aureus*). O antibiótico apresentou halo inibitório de 2,42 cm e 2,25 cm em *Escherichia coli* e em *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Após o antibiograma, verificou-se que os metabólitos produzidos pelo fungo CDSA71 apresentou inibição do crescimento bacteriano contra as cepas utilizadas.

Descritores: Metabólito Secundário. Inibição Bacteriana. Biotecnologia. Antibiograma.

PRODUCTION AND EVALUATION OF ANTIBIOTICS OBTAINED BY SEMI SOLID FERMENTATION BY FUNGUS CDSA71

ABSTRACT: The emergence of increasingly drug resistant bacteria leads to the constant prospecting and production of more effective, broad spectrum drugs, low toxicity and high specificity. The objective of the work in question was to evaluate the production of antibiotics from the fermentation process in semisolid medium, using filamentous fungi found in the Caatinga Biome, a microregion of Cariri - Paraíba. The fungus used in the experiment belongs to the genus *Aspergillus*, named CDSA71, obtained from the fungal collection of the Microbiology Laboratory of CDSA - UFCG, Sumé. The microorganism was inoculated in oat medium and after its growth the extraction of its metabolites was carried out by means of solvents. Then the metabolites were tested by means of the antibiogram to check the antimicrobial activity. The fungi were evaluated for their potential to produce antimicrobial compounds against Gram negative (*Escherichia coli*) and Gram positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria. The antibiotic presented inhibitory halo of 2.42 cm and 2.25 cm in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. After the antibiogram, it was verified that the metabolites produced by the fungus CDSA71 showed inhibition of the bacterial growth against the strains used.

Keywords: Secondary Metabolite. Bacterial Inhibition. Biotechnology. Antibiogram.

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos recursos naturais como forma de sobrevivência data da antiguidade. Com o passar do tempo e advento das novas tecnologias, as técnicas de produção de substâncias advindas da natureza avançaram de tal modo, que se tornou possível manipular formas microscópicas de vida, como fungos e bactérias, para fabricação de diversos produtos, que vão de bebidas alcoólicas a medicamentos. A descoberta do potencial antibacteriano apresentado por determinados microrganismos deu início à produção de uma revolucionária droga na história da humanidade, o antibiótico. O antibiótico é um fármaco usado no tratamento de infecções causadas por bactérias, que pode ser obtido como metabólito secundário através da fermentação em meio sólido, por fungos filamentosos (1).

Os fungos quando cultivados em meio de cultura apropriado podem sintetizar algumas substâncias de interesse industrial as quais se denominam metabólitos secundários (1). Os metabólitos secundários são caracterizados como aqueles que não são necessários para o crescimento na cultura pura. A produção desses metabólitos pode garantir ao fungo superioridade a outros microrganismos em um habitat concorrido, dando a esses metabólitos efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos.

Os fungos filamentosos são microrganismos comumente encontrados nos mais diversos tipos de ambiente, sendo capazes de realizar fermentação, processo envolvendo reações químicas catalisadas por enzimas no qual a matéria orgânica presente no inóculo é convertida em várias substâncias. O tipo de fermentação pode variar de acordo com o meio em que o fungo se desenvolve, sendo dividido em sólido e líquido (2).

Sendo organismos eucarióticos, aclorofilados, os fungos se alimentam por meio de absorção de nutrientes e se reproduzem de forma sexuada ou assexuada. Esse grupo de microrganismos tem relevante importância desde a antiguidade, e são muito conhecidos devido sua grande atuação em processos fermentativos. Devido a facilidade em ser encontrado no meio ambiente, os fungos atuam de maneira essencial na degradação da matéria orgânica, assim como na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, na medicina e na produção de medicamentos como os antibióticos.

Outra característica dos fungos, que possui suma importância, é a obtenção dos mais variados produtos extras e intracelulares podendo serem aplicados nos mais diversos fins, desde a indústria de alimentos até a indústria farmacêutica, isso só se torna possível pela capacidade que alguns fungos possuem em sintetizar certo produto dependendo do meio de cultura em que o mesmo é submetido. Sendo assim, os produtos fúngicos são amplamente explorados e aprimorados pela indústria na obtenção de enzimas, antibióticos e outros produtos (3).

Por possuir grande variabilidade ecológica, fisiológica e morfológica, torna-se complicado generalizar as particularidades dos fungos, tendo em vista que são distinguidos em três grupos distintos: cogumelos, leveduras e fungos filamentosos, sendo o primeiro considerado fungo macroscópico e os dois últimos microscópicos. Formam um amplo e heterogêneo reino, podendo ser encontrados em qualquer nicho ecológico (2). No grupo dos fungos microscópicos, os microrganismos mais aplicados na indústria, são as leveduras. Elas são cultivadas com o propósito de obter células propriamente ditas, os seus elementos celulares e os produtos finais que ocorrem do

decorrer da fermentação alcoólica. Os processos fermentativos realizados em grande escala por leveduras são responsáveis pela produção de álcool para utilização industrial; no entanto, são mais conhecidas pela sua função na fabricação de bebidas alcoólicas (4).

Apesar de serem menos utilizados, os fungos filamentosos possuem grande aplicação para a produção de diversos metabólitos, justamente por sua capacidade de crescer em meios simples e de baixo custo (5). São utilizados em inúmeros processos industriais como na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, lipídios e glicolipídios. Muitos desses fungos são comercializados, no mesmo passo em que outros possuem grande potencialidade biotecnológica (6).

Os antibióticos são metabólitos secundários sintetizados a partir de fungos e/ou bactérias, são caracterizados por possuírem a capacidade de inibir ou causar a morte de bactérias ou fungos, podendo ser compostos naturais ou sintetizados. São classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento bacteriano.

As bactérias são organismos unicelulares, que podem ser causadores de processos infecciosos; neste sentido, desde a descoberta desta possibilidade os pesquisadores procuraram agentes químicos capazes de apresentar atividade antimicrobiana. Sendo assim, através do tempo foi se desenvolvido diversos tipos de antibióticos, tendo progressos gradativos ao decorrer do avanço do conhecimento científico. Contudo, o grande marco no tratamento de infecções bacterianas se deu pela descoberta da penicilina em 1928, evidenciando que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana (7).

Dessa forma, os fungos se caracterizam como organismos com grande potencial de desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos de alto valor econômico agregado. Dentro dessa perspectiva, este trabalho objetiva a obtenção de antibióticos a partir do fungo presente no bioma Caatinga, mais precisamente no Cariri paraibano, bem como, a avaliação da sua atividade antibiótica contra duas cepas bacterianas, uma Gram positiva e outra Gram negativa (4).

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia, Laboratórios de Bioquímica e Laboratórios de Biotecnologia do CDSA – UFCG.

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Microrganismo Utilizado

O microrganismo utilizado foi o fungo CDSA71, proveniente da coleção de fungos da Caatinga presente no Laboratório de Microbiologia do CDSA, tendo como parâmetro de escolha as informações contidas no trabalho de conclusão de curso Bioprospecção de Antibióticos Produzidos por Fungos da Caatinga (3).

Meio de Cultura e Cultivo

Para a obtenção dos metabólitos secundários foi utilizado um meio composto por 5 gramas de farinha de aveia comercial, homogeneizada em 15 ml de água destilada, autoclavada por 20 minutos à 121°C, 1 atm. O fungo citado anteriormente foi inoculado e incubado em estufa de crescimento por aproximadamente 216 horas à 37°C. Todo o experimento foi realizado em triplicata (ensaio 1, ensaio 2 e ensaio 3), afim de se obter uma maior quantidade dos metabólitos secundários.

Extração por solvente

Foi adicionado em cada placa 1mL do solvente metanol para realizar a extração dos metabólitos. Em seguida os ensaios foram filtrados à vácuo, afim de se obter somente o antibiótico. Posteriormente, todos os ensaios (1, 2 e 3) foram unidos com o objetivo de obter apenas uma amostra de antibiótico. Logo após, a amostra já extraída foi levada à estufa por 48h à 50°C para evaporação do solvente, concentrando apenas o metabólito.

ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de antibiograma é comumente utilizado para identificar compostos com ação antimicrobiana, nesta pesquisa, este teste foi realizado com duas cepas bacterianas, uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e outra Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 18739). As cepas bacterianas foram obtidas pelo Professor Jean Queiroz, Laboratório de Biotecnologia – CDSA/UFMG, conservadas em meio de Ágar gel pelo método do Ágar inclinado.

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos testes antibiograma foi o ADCM, conforme segue:

| | |
|------------------|----------|
| Ágar-caseína | 32,5 g/L |
| Dextrose | 20 g/L |
| Extrato de Malte | 10 g/L |

O meio foi fundido, distribuído em dois Erlenmeyers (500 mL) e autoclavado por 20 minutos, a 121°C, 1 atm, em seguida vertido cerca de 20mL em 4 placas de Petri.

Preparo dos discos de Papel

Foram confeccionados pequenos discos de papel utilizados no teste antibiograma. Posteriormente, foi adicionado em cada disco 20 µL do antibiótico a ser testado. A fim de comparar o potencial antibacteriano dos metabólitos presentes no extrato, foram preparados discos contendo cloranfenicol na concentração de 0,3mg/L, como controle positivo e discos contendo apenas metanol, como controle negativo. A amostra e os controles (positivo e negativo) foram analisadas em triplicata.

Preparo do Inóculo Bacteriano

Para a preparação do inóculo, levou-se todo o material devidamente esterilizado para o Fluxo Laminar Vertical devidamente assepsiado.

Foi retirada com uma alça de platina, previamente flambada, uma pequena quantidade de bactérias, estas foram inseridas em solução salina (0,9%) e homogeneizada. Posteriormente, foi adicionado às placas de Petri já com o meio ADCM e os discos de papel contendo o antibiótico e os controles (positivo e negativo). Logo após, as placas foram identificadas e incubadas em câmara BOD, à 37°C por 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao fim do processo de incubação do fungo CDSA71, observou-se que todas os ensaios obtiveram um bom crescimento do microrganismo, ou seja, o fungo em questão

creceu sobre todo o espaço da placa, obtendo-se 3mL do extrato contendo o antibiótico.

Na realização do antibiograma, o metabólito produzido a partir do fungo CDSA71, apresentou boa ação inibitória para ambas as cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC 18739, do tipo Gram negativa e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, do tipo Gram positiva, como apresentado na Tabela 1.

Foi analisado e medido os halos de inibição realizado pelo antibiótico em questão, e constatou-se que o mesmo apresenta halos que variam de 2,25 cm até 2,42 cm para ambas as cepas bacterianas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), como mostrado na Tabela 1. Pode-se verificar também que o controle positivo efetuou uma boa ação, como já era de se esperar e o controle negativo não causou nenhuma ação.

Tabela 1: Apresentação dos halos de inibição verificados no antibiograma.

| AMOSTRAS | | CEPAS | |
|-----------------------|-----------|---|---|
| | | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 18739) | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) |
| ANTIBIÓTICO (CDSA 71) | \bar{X} | 2,42 cm | 2,25 cm |
| | SD | 0,70 cm | 0,75 cm |
| CONTROLE POSITIVO | \bar{X} | 2,50 cm | 2,00 cm |
| | SD | 0,71 cm | 0,0 cm |
| CONTROLE NEGATIVO | | 0,0 cm | 0,0 cm |

\bar{X} representa média do ensaio e SD o Desvio Padrão. Fonte: Acervo Pessoal

De acordo com a Tabela 1, pode-se ver que a média do halo gerado pelo antibiótico na Gram Negativa (*Escherichia coli*) foi melhor que na Gram Positiva (*Staphylococcus aureus*), ou seja, o antibiótico em questão demonstrou melhor ação em bactérias que possuem membrana externa. Através dos dados contidos na Tabela 1, como média e desvio padrão, é possível observar que o metabólito testado apresentou ação bem semelhante ao antibiótico controle em bactéria Gram negativa, já que a média da amostra (2,42cm) e a média do controle (2,50cm) foram bem semelhantes, ou seja, a ação inibitória da amostra e do controle foram próximas. Em bactéria Gram positiva houve também semelhança nos valores observados em relação à média, porém houve discrepância nos valores observados em relação ao desvio, uma vez que o desvio padrão da amostra e do controle diferem absurdamente. Logo, o antibiótico testado

efetivou ação muito semelhante ao antibiótico controle em *Escherichia coli*, porém em *Staphylococcus aureus* houve diferença.

Em pesquisa semelhante, foi isolado e avaliado a atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por diversos fungos da caatinga, observou que um outro fungo e similar ao CDSA 71, produziu uma boa atividade contra as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ou seja, é percebido que fungos filamentosos isolados da caatinga se caracterizam por possuírem metabólitos secundários contra bactérias Gram positiva e Gram negativa (3).

Em trabalho realizado, foram testados os extratos antimicrobianos sintetizados por fungos do gênero *Pleurotus*, verificou que a espécie *Pleurotus sp.* apresentou boa ação inibitória das mesmas cepas utilizadas nesse trabalho (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), sendo que o autor utilizou os microrganismos em meio bastante nutritivo, induzindo assim a síntese de uma quantidade menor de antibiótico devido a boa quantidade de nutrientes no meio (8). Enquanto que no trabalho em questão, o fungo foi inoculado em meio de aveia, que se comporta como meio escasso de nutrientes quando comparado com outros meios de cultura como BDA (batata, dextrose e ágar), ADCM (ágar, dextrose, caseína e extrato de malte) e MEA (maltose, dextrina, glicerol, peptona, e ágar). A aplicação desse tipo de meio contendo somente aveia se deu ao fato de que é um meio pouco dispendioso e assim acaba barateando o processo e a quantidade limitada de nutrientes acaba estimulando o microrganismo a sintetizar em maior quantidade seus metabólitos secundários.

Dessa forma, o antibiograma provou que o antibiótico produzido pelo fungo CDSA71 apresenta atividade inibitória no crescimento da *Escherichia coli*, assim como da *Staphylococcus aureus*.

4. CONCLUSÃO

O fungo *Aspergillus* CDSA71, coletado na Caatinga, sob condições estimulantes, produz antibiótico capaz de inibir o desenvolvimento das bactérias Gram Negativa *Escherichia coli* e Gram Positiva *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

1 BAUMER JD. Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato. 2009. 132 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

2 COUTO SR, SANROMÁN MA. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *J. Food Eng.*, v. 22 (3), p. 211-219, 2005.

3 CLEMENTINO LC. Bioprospecção de Antibióticos Produzidos por Fungos da Caatinga. 2014. 52 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande. 2014.

4 MADINGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. Biologia Celular eucariótica e microorganismos eucarióticos, *In: Microbiologia de Brock*, Pentice Hall, 10 ed, São Paulo, 2014.

5 MEYER V. Genetic engineering of filamentous fungi: Progress, obstacles and future trends, *Biotechnology Advances*, 26: 177-85, 2008.

6 ADRIO JL, DEMAÏN AL. Fungal Biotechnology. *International Microbiology*, 6: 191-199, 2003.

7 GUIMARÃES DO, MOMESSO LS, PUPO MT. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. *Química Nova*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, 2009. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/qn/v33n3/35.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

8 WISBECK E, ROBERT AP, FURLAN SA. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Health and Environment Journal*, v. 3, n. 2, p. 7-10, 2002.