

## PROSPECÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS

Rhyanne F. de Q. Nascimento<sup>2</sup>; Breno Lino Pinheiro Sousa<sup>2</sup>, Raíssa Mayane S. Bezerra<sup>2</sup>, Rayza Morganna Farias Cavalcanti<sup>3</sup>; Renally Barbosa da Silva<sup>3</sup>; Jean César Farias de Queiroz<sup>1\*</sup>;

1. Docente da Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento/Universidade Federal de Campina Grande (UATEC/UFCG). \*Correspondência: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido - CDSA Rua Luiz Grande, S/N – Sumé, Paraíba, Brasil - CEP 58540-000. E-mail para correspondência: [queiroz@ufcg.edu.br](mailto:queiroz@ufcg.edu.br)
2. Bacharelem Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento/Universidade Federal de Campina Grande (UATEC/UFCG).
3. Engenheiros de Biotecnologia e Bioprocessos pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

### RESUMO

Desde tempos remotos a humanidade tem utilizado produtos naturais com o propósito de obter a cura de suas enfermidades, o advento da bioquímica e a descoberta de microrganismos proporcionaram uma nova fonte de substâncias naturais a serem utilizados como medicamentos. Hoje, com a maior diversidade de microrganismos patogênicos e de bactérias multirresistentes, este é um dos principais focos da biotecnologia: a prospecção de novos compostos bioativos, que venham a se tornar um produto de utilização farmacológica. Frente a isto, este trabalho teve como objetivo a busca por fungos, que são os maiores produtores de antibióticos, em um ambiente inóspito e pouco explorado, como é a Caatinga, visando inovação na indústria farmacêutica. Estes fungos foram coletados e analisados pelo seu potencial em produzir compostos antimicrobianos contra duas cepas de bactérias *Escherichia coli* (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram positiva). Todos os 44 espécimes analisados apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido (ADCM), 86,36% apresentam atividade contra *E. coli* e *S. aureus* e apenas 13,63% apresentaram atividade antimicrobiana contra apenas uma dessas bactérias, com ênfase nas espécies nomeadas CDSA92 e CDSA81, que desenvolveram halos de inibição contra as bactérias citadas de 23mm e 15 mm de diâmetro, respectivamente.

**Descritores:** Bioprospecção. Microrganismos. Compostos antimicrobianos.

### PROSPECTION OF CAATINGA'S FUNGI PRODUCER OF ANTIBIOTICS

#### ABSTRACT

Since ancient times mankind has used natural products in order to get cured of their diseases, and with the advent of biochemistry and the discovery of microorganisms have brought a new source of natural substances to be used as medicines. Today, with the greatest diversity of pathogens and multidrug-resistant bacteria, this is a major focus of biotechnology: the search for new bioactive compounds, which will become a product of drug use. Faced with this, this project aimed to search for fungi, which are major producers of antibiotics, in a harsh environment and poorly explored, as is the Caatinga, in order innovation in the pharmaceutical industry. These fungi were collected and analyzed for their potential to produce antimicrobial compounds against two bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. All of the new 44 fungal specimens show some antimicrobial activity, of which 86,36% possessed activity against both, *E. coli* and *S. aureus*, and 13,63% activity against only one of these bacteria, with emphasis on specimens named CDSA92 and CDSA81, that showed inhibition zones against bacteria strains, about 23mm and 15mm diameter, respectively.

**Keywords:** Bioprospecting. Microorganisms. Antimicrobial compounds.

## INTRODUÇÃO

O termo antibiótico é definido como substâncias sintetizadas por microrganismos com a capacidade de inibir o crescimento ou destruir outros microrganismos. Atualmente, este conceito foi expandido também para diversas substâncias de origem sintética, derivados miméticos de produtos naturais, além de metabólitos secundários de plantas, que apresentam atividade antimicrobiana (1).

Os primeiros relatos do uso dessas substâncias pelo homem são muito antigos, porém, o primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi a penicilina, substância sintetizada pelo fungo *Penicilliumchrysogenun*, com capacidade de inibir o crescimento bacteriano (2). Na década de 40, seu emprego em larga escala acarretou uma redução do índice de mortalidade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial para 3,9%, na Segunda Guerra, motivando à produção industrial da penicilina, o primeiro medicamento produzido em grande escala, dando início a indústria farmacêutica. Com esta descoberta iniciou-se à exploração dos microrganismos como fonte de substâncias biologicamente ativas. Com a expansão do uso dos antibióticos, na década de 70, acarretou a descoberta de substâncias com maior espectro de ação, obtendo-se medicamentos mais potentes com melhor farmacocinética e menos efeitos colaterais (3). Nos últimos anos, o surgimento de novos alvos bacterianos, a evolução de doenças infecciosas e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos pelas bactérias patogênicas, devido ao uso destes medicamentos em subdosagens ou por um período de tempo insuficiente, geraram o retorno do interesse em novas classes de substâncias com atividade antibiótica.

Dentre todos os fatores que apontam a necessidade por novas classes de antibióticos, o considerado mais relevante é a demanda por novos agentes antifúngicos de ação mais rápida e mais eficiente, devido às diversas estimativas que mostram que cerca de 40% de todas as mortes por infecções hospitalares nos últimos 20 anos tenham sido causadas por fungos (4). Nos dias atuais, os diversos antibióticos disponíveis no mercado são produtos de síntese ou semi-síntese, porém a maioria das classes de fármacos antibióticos usados na terapêutica atual teve, como modelos, produtos naturais sintetizados por microrganismos (5).

A busca por novos produtos para a indústria farmacêutica e biotecnológica é um processo que requer otimização contínua, o estudo que une aspectos químicos e propriedades biológicas dos metabólitos fúngicos é alvo de interesse mundial da comunidade científica, conduzindo a resultados que justificaram a obtenção de

medicamentos e aditivos de alimentos de grande sucesso comercial e o registro de centenas de patentes (3).

Por um determinado tempo, a química combinatória e ensaios de larga escala foram o foco do desenvolvimento de pesquisas, mas não atingiu o impacto e objetivos esperados, sendo assim, os produtos naturais ainda permanecem como importantes ferramentas para a descoberta de novos fármacos. Os produtos naturais possuem inúmeras vantagens que justificam sua importância, dentre elas: uma enorme diversidade química, complexidade estrutural e atividade biológica, são fonte de farmacóforos, sendo recursos pouco explorados, podendo, então, surgir novos compostos bioativos. Atualmente, pesquisadores têm voltado atenção para fontes ainda pouco investigadas, como microrganismos marinhos, extremófilos, endofíticos (6) e do Bioma Caatinga (7).

É estimado que existam ao menos 250.000 espécies de plantas, mais de 300 milhões de espécies de insetos, 1,5 milhão de espécies de fungos e um número semelhante de algas e procariotos. Estas espécies coexistem em ecossistemas e interagem entre si de diversas maneiras. Acredita-se que centenas de milhares de compostos naturais estejam presentes em plantas e microrganismos, sendo que a maioria deles ainda não foi caracterizada (8). O conhecimento da diversidade de fungos conidiais na região semiárida brasileira é bastante pontual (9).

De modo geral, os fungos são organismos eucariotos, aclorofilados, apresentando nutrição absorptiva, reprodução sexuada ou assexuada, estruturas somáticas com parede celular. Algumas das classes que mais têm fornecido espécies produtoras de metabólitos de interesse são endófitos, fitopatogênicos, entomopatogênicos, rizoféricos, leveduriformes, de solo e isolados de organismos marinhos, embora fungos mais abundantes na natureza, produtores de esporos e de fácil cultivo, sejam classicamente mais estudados, independente da classe a que pertencem. Fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos, são amplamente estudados. Alguns metabólitos secundários, como o ácido micofenólico ativo contra bactérias Gram-positivas, são produzidos por várias espécies deste gênero (*P. brevicompactum*, *P. paxilli*, *P. olivicolor*, *P. canescens*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*, *P. rugulosum* e *P. expansum*) sendo, portanto, considerados marcadores em algumas espécies (10).

Aliado ao fato do Brasil possuir uma extraordinária diversidade biológica e a necessidade da indústria farmacêutica por metabólitos fúngicos para o desenvolvimento de novos fármacos, a prospecção de fungos da Caatinga para produção de compostos

bioativos, traz uma enorme expectativa na descoberta de novos fármacos e uma nova perspectiva para a prospecção biotecnológica no semiárido.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia (BioLab) do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Todos os materiais utilizados foram devidamente autoclavados a 121 °C, 1atm, por 20 minutos.

### Isolamentos dos fungos

A coleta dos microrganismos foi realizada em uma área úmida da Caatinga, em que foram coletadas amostras de folhas de plantas e solo de diferentes locais das mediações do CDSA/UFCG. As amostras foram mantidas em tubos de plástico contendo 1 mL de solução salina, em seguida, foram homogeneizadas. O líquido superficial presente nos tubos foi depositado na superfície de cada placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura, de maneira uniforme, utilizando para isto a técnica de arraste.

As placas foram identificadas com seus respectivos conteúdos, meio com amostras provenientes de plantas e meio com amostras provenientes do solo, e incubadas por 72 horas à 37°C.

### Meios de cultura

Para prospecção dos fungos da Caatinga foram utilizados os meios BSA, composto por Batata (100 g/L), Sacarose (20 g/L) e Ágar (5 g/L) e o meio ADM, composto por Malte (10 g/L), Dextrose (20 g/L) e Ágar (5 g/L), previamente autoclavados a 121°C, 1 atm, por 20 minutos(11).

Para produção de metabólitos foi utilizado o meio de cultura composto de aveia (5 g) e água destilada (15 g/L), este meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm por 60 minutos (12). Para o cultivo das cepas bacterianas e os testes antibiograma foi utilizado o meio ADCM, constituído por Extrato de Malte (10 g/L), Dextrose (20 g/L) e Ágar Caseína (32,5 g/L), autoclavado a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos.

### Purificação e Coleção

As colônias que cresceram nas placas foram transferidas para purificação, inoculando-as em um ponto distinto de uma nova placa contendo 20 mL do meio de

cultura BSA ou ADM, totalizando quatro inóculos de diferentes colônias por placa. Os microrganismos foram incubados até a produção de esporos fúngicos.

Os fungos que apresentaram melhor desempenho de crescimento, sem prejudicar o crescimento dos demais, foram armazenados em vidro âmbar de 20 mL contendo 10 mL de meio BSA ou em vidro âmbar de 30 mL contendo 15 mL de meio de cultura ADM, logo após foram vedados, etiquetados e armazenados na geladeira na forma de coleção. Os fungos foram denominados como CDSA em ordem numérica complementando a coleção já existente no CDSA. Esta coleção foi utilizada para os inóculos seguintes.

### **Cultivo de Fungos em Meio de Aveia**

Após a obtenção de um número razoável de fungos cultivados na forma de coleção, iniciou-se o cultivo em meio de aveia para produção de metabólitos. Os fungos armazenados em vidro âmbar foram cultivados em recipientes com meio de aveia, em seguida, foram armazenados por 120 horas a temperatura 37 °C.

### **Extração dos Metabólitos secundários**

A extração dos metabólitos produzidos pelos fungos incubados em meio de aveia foi realizada utilizando o clorofórmio como solvente de extração. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio nos recipientes, o líquido resultante foi filtrado, utilizando papel de filtro previamente autoclavado, e armazenados em tubos plásticos de 12 mL.

### **Diluição bacteriana**

Para realização dos testes antibiograma foi utilizado duas cepas de bactérias, uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e uma Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922). As linhagens de bactérias foram cedidas pelo Prof. José Pinto de Siqueira Júnior, Departamento de Biologia Molecular – UFPB, conservadas em meio de cultura Infusão de Cérebro-Coração em Ágar (BHIA).

Foi realizada uma diluição seriada de  $10^{-6}$  das duas cepas bacterianas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), após 12 horas de incubação a 37°C das linhagens no meio ADCM foi realizada a contagem, utilizando para os testes antibiogramas 167 UFC por placa.

### **Teste antibiograma**

Para testar as atividades antimicrobianas dos extratos fúngicos utilizou-se como suporte discos de papel filtro de 5mm de diâmetro, aproximadamente. Nestes discos

foram inseridos 10µL de cada extrato, como controle positivo adotou-se os discos contendo 10µL de Amoxicilina.

Em placas de Petri com o meio ADCM foram distribuídos 1 mL de solução bacteriana *E. coli* e *S. aureus*, em seguida, os discos foram inseridos sobre o inóculo bacteriano. As placas foram identificadas e incubadas a 37°C por 12 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos coletados no Bioma Caatinga, nas mediações do CDSA/UFCG, foram armazenados sob refrigeração (4°C), ampliando a coleção de fungos filamentosos da Caatinga do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Jean César F. Queiroz, totalizando 44 novos espécimes para coleção (Figura 1), atualmente composta por 117 fungos filamentosos da Caatinga.



**Figura 1.** Fungos da coleção armazenados em meio ADM sob refrigeração.

Para produção de metabólitos secundários o meio de aveia foi utilizado por ser um meio pobre em nutrientes, estimulando, deste modo, a produção de metabólitos como forma de sobrevivência dos fungos. Os metabólitos secundários são sintetizados por meio de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, onde o resultado é a síntese de um produto que favoreça a sobrevivência. Um meio com apenas uma fonte de nutriente, a aveia, induz o fungo a produzir substâncias de defesa para vencer a concorrência na obtenção de alimento, geralmente esse fato é evidenciado pela esporulação e, conseqüentemente, a cor peculiar que o fungo obtém no meio de aveia. Pesquisas comprovam que a produção de metabólitos secundários está relacionada à coloração obtida pelo desenvolvimento do fungo no meio (13), como foi observado neste estudo a coloração esverdeada e acinzentada dos fungos da Caatinga quando cultivados por um determinado período de tempo em meio de aveia. A partir dessas observações, foi realizada a extração com clorofórmio como solvente para extração dos metabólitos. Esse cultivo, diferentemente do BSA e do ADM é

demorado, tendo em vista que o fungo se encontra em meio desfavorável, o que promove retardo no seu crescimento.

Dos 44 novos espécimes fúngicos armazenados na coleção, todos apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivados em meio semi-sólido (ADCM), sendo que 86,36% apresentam atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, com 77,27% dos extratos apresentando halos de atividade antimicrobiana maior contra *E. coli*. Apenas 13,63% apresentaram inibição contra apenas uma dessas bactérias. Este resultado é considerado estimulador por apresentar atividade diversificada frente às linhagens bacterianas, demonstrando que os metabólitos secundários produzidos pelos fungos filamentosos da Caatinga possuem atividade antimicrobiana específica.

Os dados métricos dos antibiogramas foram convertidos em uma tabela com a ação antibacteriana dos extratos obtidos de todos os fungos da coleção, onde as linhagens fúngicas foram denominadas de CDSA (Tabela 1). Considerando o halo de inibição do controle positivo Amoxicilina de 30mm, neste estudo, merece destaque os extratos dos espécimes que desenvolveram halos de inibição superior a 20 mm (Figura 2), como o espécime CDSA87 com halo de inibição de 33 mm de diâmetro para *E. coli* e os espécimes CDSA73, CDSA84 e CDSA100 com halos de 25mm, 26mm e 27mm, respectivamente. Para halos contra a bactéria *S. aureus*, os espécimes CDSA84, CDSA108 e CDSA116 apresentaram desempenho superior aos demais, com halos de inibição de 25mm, 22mm e 23mm, respectivamente.

**Tabela 1.** Ação antibacteriana de extratos dos fungos filamentosos da Caatinga.

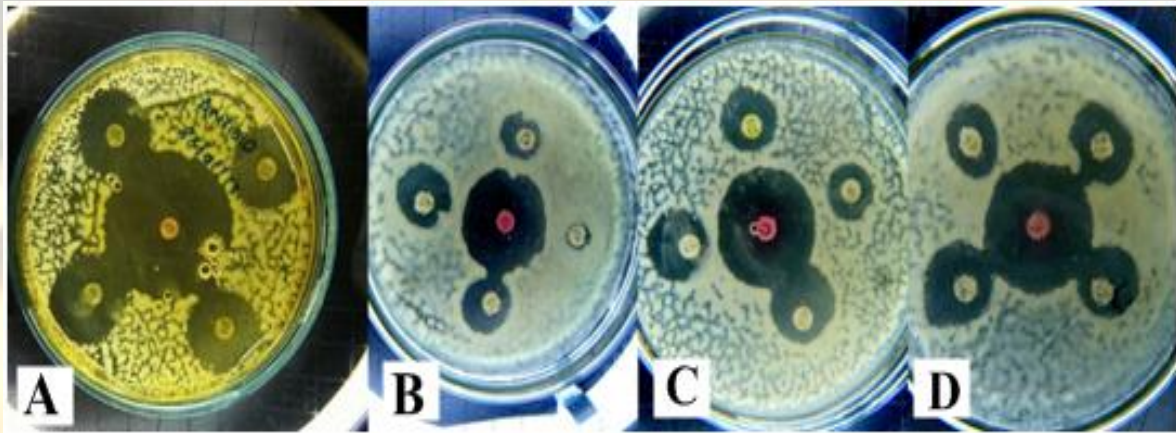
LINHAGENS FUNGICAS	LINHAGENS BACTERIANAS	
	Escherichia coli ATCC 25922(mm)	Staphylococcus aureus ATCC 25923 (mm)
CDSA73	25	16
CDSA74	20	12
CDSA75	10	15
CDSA76	06	15
CDSA77	10	-
CDSA78	21	12
CDSA79	17	15
CDSA80	17	15
CDSA81	-	15
CDSA82	15	15
CDSA83	22	21
CDSA84	26	25
CDSA85	14	12
CDSA86	23	10
CDSA87	33	20
CDSA88	21	20
CDSA89	21	16
CDSA90	20	16
CDSA91	23	16
CDSA92	23	-
CDSA93	20	10
CDSA94	09	08
CDSA95	21	20
CDSA96	19	15
CDSA97	16	-
CDSA98	20	11
CDSA99	17	17
CDSA100	27	20
CDSA101	21	16
CDSA102	17	05
CDSA103	05	19
CDSA104	22	20
CDSA105	11	10
CDSA106	21	15
CDSA107	20	15
CDSA108	20	22
CDSA109	16	17
CDSA110	20	18
CDSA111	20	19
CDSA112	17	13
CDSA113	17	14
CDSA114	25	07
CDSA115	13	-
CDSA116	15	23
CDSA117	-	15

**Legenda:** - Os extratos fúngicos não apresentaram formação de halo contra a cepa testada.

A maioria das pesquisas de novos compostos antibióticos consiste em modificações químicas de antibióticos naturais, ou seja, pela via semi-sintética (14). Assim, a pesquisa do potencial antimicrobiano derivados de fontes naturais, como os realizados nesta pesquisa e em biomas como a Caatinga, caracterizado com um Bioma



com baixa exploração biotecnológica, se torna justificável, tendo em vista seu enorme potencial.



**Figura 2.** Placas contendo os testes de antibiograma, onde o disco central é o disco controle (Amoxicilina 100mg/mL) e os outros discos são os extratos obtidos das amostras fúngicas. Onde **(A)** e **(B)** mostram o teste antibiograma feito com bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e **(C)** e **(D)** mostram o teste antibiograma feito com bactéria Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922).

### CONCLUSÃO

Os 44 espécimes analisados de fungos filamentosos da Caatinga possuem potencial para futuros antibióticos comerciais. O bioma Caatinga demonstrou neste estudo potencial biotecnológico como fonte de novos compostos bioativos.

### AGRADECIMENTOS

Aos Técnicos, Ana Paloma Taveres de Araújo e Adriano Marques dos Santos, do Laboratório de Biologia da UFCG – CDSA, pelo apoio. Ao professor José Pinto de Siqueira Júnior do Departamento de Biologia Molecular – UFPB, pela concessão das cepas bacterianas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Strohl WR. *Biotechnology of antibiotics*. 2ª ed. New York: Marcel Dekker; 1997.
2. Korolkovas A, Burkhalter JH. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1988.
3. Takahashi JA, Lucas EMF. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*. 2008; 31 (7): 1807-1813.
4. Zhang W, Becker D, Cheng Q. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug. Discovery*. 2006; 1:224.
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70 (3): 461-77.
6. Crag GM, Newman DJ. Biodiversity: a counting source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*. 2005; 77 (1): 7-24.
7. Rêgo Júnior NO, Fernandez LG, Castro, RD, Silva LC, Gualberto AS, Pereira MLA, Silva MV. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Braz. J. Food Technol*. 2011; 14 (1): 50-57.

8. Pimm, SL, Russell, GJ, Gittleman JL, Brooks TM. The future of biodiversity. *Science*. 1995; 269: 347-350.
9. Gusmão LFP, Maia LC. Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido brasileiro. Recife: Instituto do Milênio do Semi-árido, MCT/Associação Plantas do Nordeste. 2006; 161-201.
10. Vinokurova NG, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Arinbasaroy MU, Ozerskaya SM. Production of mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link. *Appl Biochem Microbiol*. 2005; 41: 83-86.
11. Gava MA. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos. [Dissertação] São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo; 2002.
12. Brunelli KR, Fazza AC, Athayde Sobrinho C, Camargo LEA. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopathologica*. 2006; 32(1), 92-94.
13. Firn RD, Jones CG. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Natural Products Reports*. 2003; 20: 382-391.
14. Demain AL. Microbial Biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2000; 18 (1): 26-31.