

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ISOLADOS DE CORAIS E ESPONJAS ENCONTRADOS NO LITORAL PERNAMBUCANO

Andressa Laís Ferreira Silva¹; Idjane Santana de Oliveira²

¹Estudante do Curso de Nutrição – CAV - UFPE; E-mail: andressa.lfs@gmail.com, ²Docente/pesquisador do Núcleo de Nutrição – Laboratório de Microbiologia e Imunologia – CAV – UFPE;. E-mail: idjaneoliveira@gmail.com

Sumário: Nas águas marinhas, que cobrem mais de 70% da superfície terrestre, encontram-se vários organismos, entre eles algas, esponjas e corais que podem produzir substâncias bioativas potentes e diversificadas conhecidas como metabólitos secundários. Associados a essas algas e também produtores de metabólitos de interesse na área médica, encontram-se os fungos. Os objetivos do presente trabalho foram: 1.isolar e preservar fungos marinhos obtidos a partir de algas; 2. Identificar morfológica e molecularmente todos os isolados e testar a atividade antimicrobiana dos metabólitos dos fungos marinhos. As algas vermelhas estão entre as principais produtoras de metabólitos secundários no ambiente. (MACHADO, 2010)

Palavras-chave: águas-marinhas; metabólitos; morfológica.

INTRODUÇÃO

O isolamento dos fungos foi feito inicialmente de algas coletadas na praia de Boa Viagem –PE. As algas foram lavadas e fragmentadas e semeadas em meio Ágar marine, Sabouraud e BDA. Após 3 dias de incubação a temperatura ambiente, os fungos foram repicados para meio MEA com água do mar. Foram isolados 3 fungos, todos do gênero *Aspergillus*, sendo 2 isolados da secção *flavi* e 1 da secção *ochraceus*. Para a preservação dos fungos foi feito repique em placa de Petri no meio MEA e a partir do crescimento dos fungos, cerca de 7 dias, os mesmos foram preservados em água destilada e em óleo mineral. Para a preservação com água destilada canudos foram utilizados para retirar 3 fragmentos com micélio fúngico. Os 3 fragmentos foram colocados na água destilada e armazenados em geladeira. Para a preservação em água mineral, foi preparado o meio ágar nutriente inclinado em tubos de ensaio com 4 mL. Os fungos cresceram por 5 dias em temperatura ambiente e após esse tempo foi acrescentado óleo mineral esterilizado até cobrir o fungo e o meio. Após esse processo os fungos foram conservados em temperatura ambiente. Os fungos repicados foram colocados em tubos de ensaio contendo caldo glicosado e caldo de YES, onde objetivou-se favorecer o crescimento dos fungos e a produção dos seus metabólitos secundários. 1 disco do fungo cortado com canudo esterilizado foi colocado no tubo com cerca de 15 mL com caldo glicosado e com YES. Após os 20 dias de crescimento dos fungos os mesmos foram filtrados em papel de filtro esterilizado, o líquido filtrado, conhecido como líquido metabólito foi colocado em tubos de Falcon e armazenado em geladeira para posteriores testes. Após a filtração, a massa micelial dos fungos foi prensada com auxílio de jornais e o micélio foi macerado e foi acrescentado clorofórmio aos mesmos dentro de béqueres individuais para os fungos e meios.

MATERIAIS E MÉTODOS

O clorofórmio foi evaporado por cerca de 10 dias em capela de exaustão. **Teste de atividade antimicrobiana.** Segundo a ANVISA (2008) o teste de disco-difusão em ágar

foi descrito em 1966, por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. As placas são incubadas por 18 a 24 horas em ar ambiente ou a 5 a 7% de CO₂ a 35°C, antes dos resultados serem determinados. Para o teste foi feito o repique das seguintes bactérias: *Enterococcus faecalis* Isolado 3 - ATCC 29212), *Shigella flexneri* (isolado 4 - ATCC 12022), *Kocuria rizophila* (isolado 8 - ATCC 9341), *Streptococcus pyogenes* (isolado 12 – cepa clínica de ferida), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina – isolado 13 – cepa clínica de ferida), *Salmonella typhimurium* (isolado 14 - ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (isolado 17 - ATCC 29213), *Enterobacter cloacae* (isolado 18 – ATCC 13047). O repique foi feito de Ágar Mueller Hinton para placas de Petri e ágar nutriente em tubos de ensaio. As bactérias ficaram em estufa, sob a temperatura de 34°C por cerca de 24 horas e depois foram guardadas em geladeira. Após o crescimento das bactérias foi preparado tubos com solução salina seguindo a escala de Mc Farland 0,5. Em placas contendo Ágar Mueller Hinton, foi semeada a bactéria a partir da solução salina com swabs estéreis. O líquido metabólito foi distribuído em disco de papel de filtro com 20 microlitros cada. Como cada fungo produziu metabólito no meio YES e no caldo glicosado as placas continham 6 discos: 2 com metabólitos e 4 com antibióticos para serem controle (cloranfenicol, amicacina, ampicilina e ciprofloxacina). As placas contendo as bactérias, os metabólitos e os antibióticos foram colocadas na estufa por 24 horas.

RESULTADOS

Após a coleta de algas, foi identificada a alga vermelha do filo *Rhodophyta*. Foram isolados dois fungos, ambos do gênero *Aspergillus*, sendo o isolado A1 pertencente a secção flavi e o isolado A2 pertencente a secção ochraceus. Observou-se que todas as bactérias foram sensíveis aos antibióticos padrão usados como controle positivo dos experimentos. Dentre os líquidos metabólicos de fungos testados, o líquido metabólico 1 produzido em meio YES foi pouco ativo contra as bactérias *Shigella flexnerii* e *Salmonella typhimurium* (Figura 1 A), induzindo halos de inibição de 7 e 6 mm, respectivamente. Enquanto que o líquido metabólito 2 produzido em meio caldo glicosado apresentou pouca atividade antibacteriana contra MRSA, com halo de inibição de 6 mm. (Figura 1 B)

DISCUSSÃO

Aparentemente o meio de cultura caldo YES mostrou melhor condição de produção de metabólitos secundários fúngicos com atividade antimicrobiana, o que pode estar relacionado a quantidade de nutrientes disponíveis para o fungo, tendo em vista que é um meio rico em carboidrato para crescimento e sobrevivência do fungo, o que favoreceu seu metabolismo. Além disso, o sulfato de magnésio, o sulfato de cobre e o sulfato de zinco podem ter sido micronutrientes importantes para o crescimento e esporulação do fungo e sua consequente produção de metabólito. Pois, isolado A1 produziu metabólitos nesse meio que possibilitou pouca atividade, mas existente, contra bactérias Gram-negativas, um grupo importante de bactérias e com pouca diversidade de antibióticos comerciais disponíveis. O valor abaixo da referência de 10mm para os halos de inibição, podendo estar relacionado a dificuldade de solubilização e mobilidade dos metabólitos no meio sólido Agar Mueller-Hinton. Experimentos em caldo Mueller-Hinton pelo método da microtitulação, igualmente preconizado pela ANVISA será realizado para confirmar a atividade antibacteriana dos líquidos metabólicos, considerando ser esse método pelo menos 30x mais sensível que o método de difusão em disco.

CONCLUSÕES

Os resultados são promissores para controle de infecções causadas por bactérias Gram – negativas, grupo bacteriano mais difícil de se desenvolver novas drogas. As bactérias que foram sensíveis ao metabólito têm importância na saúde humana e no meio ambiente, por serem patogênicas e consideravelmente resistentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORSE, et al. Marine Fungi of India (monograph). 2012. 488pages. Broadway publishing house.
- CIMINO, G., GHISELIN, M. T., In Marine Chemical Ecology (eds McClintock, J. B. and Baker, B. J.), CRC Press, Boca Raton, pp. 115–154. 2001.
- Machado, FLS et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. Curitiba, Rev. Bras. Farmacognosia, v.20, n3. Jun/Jul 2010.
- Ostrosky, EA et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. João Pessoa, Rev. Bras. Farmacognosia, v.18, n2. Abr/Jun 2008.
- Uso Racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm .> Acesso em 06 ago 2015.
- WANG, X; MAO, Z.G.; SONG, BING-BING A ET AL. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from Mangrove-derived fungi in the south China sea. Marine Drugs. 11, p. 3601-3616.