

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Bacillus cereus*

Alan Garcia Cardoso da SILVA¹

Tatiane Dias de SOUZA²

¹Farmacêutico e Químico, Doutorando em Química Analítica (UFBA) e Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS- alan.farma@hotmail.com.

²Farmacêutica pela Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS e Licenciada em Química pela Universidade do estado da Bahia – UNEB – tati_d_s@gmail.com

Recebido em: 13/01/2016 - Aprovado em: 19/08/2016 - Disponibilizado em: 18/12/2016

RESUMO:

Os antimicrobianos são amplamente utilizados, porém o uso indiscriminado tem aumentado o aparecimento de microrganismos resistentes produzindo infecções de difícil tratamento e cura. Sendo assim, surgir como alternativa a pesquisa de novas moléculas antimicrobianas a partir de produtos naturais. Com isso, o semiárido tornou-se um ecossistema brasileiro que tornou-se alvo da comunidade científica e de empresas, principalmente indústria de medicamentos, devido a presença de uma alta taxa de biodiversidade. Neste estudo foi realizada uma coleta da rizosfera de plantas do gênero das Stachytarpheta em áreas definidas no município de Mucugê. Após a realização de um “screening” (Testes antifúngicos) de extratos de linhagens isoladas, foi selecionada uma linhagem identificada através do sequenciamento do DNA como *Bacillus cereus*. Observou-se uma atividade inibitória significativa dos extratos frente à *Candida albicans*, que através do bioautografia, visualizou-se que Rf 0,43 é a fração que obteve maior eficiência na inibição do patógeno. O estudo evidenciou uma importante etapa na pesquisa de um composto com atividade antimicrobiana, porém é necessária a realização de estudos mais minuciosos para alcançar maior ação frente ao patógeno analisado.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Bioprospecção. Bioautografia. *Bacillus cereus*. *Candida albicans*.

ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN VITRO* SIDE METABOLITES PRODUCED BY *Bacillus cereus*

ABSTRACT:

Antimicrobials are widely used, indiscriminate use has increased the emergence of resistant microorganisms producing difficult to treat and cure infections. Thus, emerging as alternative search for new antimicrobial molecules from natural products. Thus, the semiarid region has become a Brazilian ecosystem that became the target of the scientific community and companies, especially the pharmaceutical industry, due to the presence of a high rate of biodiversity. In this study we made a collection of the rhizosphere of plants of the genus of Stachytarpheta in areas defined in Mucugê. After conducting a "screening" of strains isolated from extracts, was selected a strain identified through DNA sequencing as *Bacillus cereus*. There was a significant inhibitory activity against the *Candida albicans* extract, which by bioautography visualized Rf 0.43 is the fraction with highest efficiency inhibiting. The study showed an important step in search of a compound with antimicrobial activity, but it is necessary to carry out more detailed studies to achieve greater action against the pathogen analyzed.

Keywords: Antimicrobial. Bioprospecting. Bioautography. *Bacillus cereus*. *Candida albicans*.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas sistêmicas têm aumentado de forma alarmante durante as

últimas décadas, constituindo-se num dos problemas mais graves tanto do ponto de vista hospitalar quanto de saúde pública, um

exemplo importante é o fungo *Candida albicans* e os dermatófitos (NARDIN *et al.*, 2006). O tratamento dessas infecções não tem se mostrado abrangente em sua totalidade pelo surgimento do crescente aumento de espécimes resistentes aos antifúngicos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; KHAN *et al.*, 2009; KIRAZ; YASEMIN, 2011;). Desta forma, ressalta a importância de identificar e caracterizar novos compostos químicos que possibilite a obtenção de substâncias capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento dos fitopatógenos (SILVA *et al.*, 2009)

Nesta busca incessante por drogas mais efetivas, os metabólitos oriundos de microrganismo apresentam substâncias com atividade farmacológica significativa, algumas das quais já serviram de base para a síntese de medicamentos. No período de 2000-2006, aproximadamente 50% de moléculas químicas novas extraídas a partir de produtos naturais demonstraram a sua importância para o desenvolvimento de drogas no tratamento de doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Nesse sentido, tem sido estudada a atividade antifúngica de várias classes de compostos químicos, naturais ou seus modelos sintéticos, como alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, diterpenos, cumarinas e imidas sobre fungos filamentosos e leveduras (PERRV; FOSTER, 1994; FAVEL *et al.*, 1994; CECHINEL FILHO *et al.*, 1996, LIMA *et al.*, 2006; NAKAMURA *et*

al., 2008; RAMASAMY K. *et al.*, 2010, FERREIRA *et al.*, 2012, XUE *et al.*, 2012).

Em especial, destaca-se o gênero *Bacillus* spp. se como excelente agente de biocontrole maior prevalência devido a formação de endósporo e com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (CAMPOS SILVA *et al.*, 2008; LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010; PAZ; 2010; LIMA *et al.*, 2014).

Dentre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana destaca-se o método de difusão em placas (CELOTTO *et al.*, 2003) e a bioautografia. Esta última é considerada uma técnica de fácil execução, precisão e baixo custo para identificação da atividade inibitória, frente a fungos ou bactérias, de um determinado componente. De acordo com Melo (2005), a bioautografia é considerada um ensaio eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana, pois menos de 2,5 µg da substância utilizada é suficiente para a formação do halo de inibição.

Entretanto, há necessidade de intensificar os estudos no semi-árido devido a vulnerabilidade climática da região, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1994) afirmava que 54% do bioma caatinga, com vegetação característica do semi-árido, encontrava-se em elevado estágio de antropização. Na velocidade em que ocorre o fenômeno de extinção de espécies, muitas

plantas e animais com propriedades medicinais ou fontes potenciais de compostos bioativos correm o risco de desaparecer antes do seu valor ser reconhecido, o que torna ainda mais urgente intensificar os investimentos nesta área. Os fatos mencionados justificam o presente trabalho, cujo objetivo avaliar a atividade antifúngica de compostos extraídos do sobrenadante de *Bacillus cereus* isolados da rizosfera de plantas do gênero *Stachytarpheta* coletadas no semi-árido (no município de Mucugê/BA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de Coleta do solo rizosférico

O campo em estudo delimitado neste trabalho é a região da Chapada Diamantina – cidade de Mucugê, a escolha e amostragem de solos e plantas foram realizadas segundo os padrões internacionais de coleta, incluindo as coordenadas geográficas. Inicialmente, coletou-se as amostras de solo rizosférico de plantas da família Verbenaceae, gênero *Stachytarpheta*, em seguida essas amostras foram catalogadas, através de ficha de coleta, para posterior processamento.

Isolamento, purificação e caracterização de linhagens bacteriana

O ensaio foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. As amostras de solo da rizosfera, após uma

diluição seriada, foram semeadas em meio específico para bactérias, e incubados à temperatura adequada. As placas contendo contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) menores que 200 colônias foram utilizadas para o isolamento, tendo-se como critérios as características morfológicas e microscópicas distintas. As linhagens bacterianas foram selecionadas através de um “screening” (Testes antifúngicos) com os extratos obtidos a partir da cultura líquida. Em seguida, foram caracterizadas pelo método clássico de identificação através de Testes Morfológicos (forma, margem, cor, densidade, entre outros) e Testes Bioquímicos (Teste de Gram, catalase e citocromo-oxidase). Após os ensaios de avaliação da atividade fúngica, a linhagem selecionada foi submetida ao sequenciamento do gene 16S rDNA para obter identificação da espécie.

Obtenção de metabólitos secundários

Para o crescimento em meio líquido, os microrganismos foram crescidos em um volume de 2000 mL de caldo nutritivo, sob agitação, por 24 h, à 28°C. A partir do filtrado livre de células, obtido por centrifugação, procedeu-se o processo de extração com solvente orgânico. Nessa etapa, fez-se a extração dos metabólitos presentes no sobrenadante, com auxílio de um funil de separação, utilizando o acetato de etila, em seguida submeteu-se ao rotaevaporador.

Avaliação da atividade antifúngica

Para o estudo da atividade antifúngica do extrato extratos obtidos de culturas isoladas da rizosfera de plantas do gênero *Stachytarpheta* utilizou-se o teste de difusão em ágar (Pinto *et al.*, 2003) e a bioautografia direta, métodos adaptados de Auer e Bettiol (1986) e Stangarlin *et al.* (1999). A utilização deste ensaio tem como objetivo encontrar alguma inibição no crescimento micelial de isolados de *Candida albicans*, *Microsporum gyparum* e *Trichophyton rubrum*, fornecidos pelo Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Teste de difusão: perfuração em Agar

Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido (Sabouraud) foi realizada com auxílio de cilindros de 6mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais seguida injetou-se 20 µL do extrato e incubou a placa a uma temperatura adequada (28°C). Além do extrato bruto, na mesma placa colocou-se mais dois poços, um com água destilada e outro com o solvente utilizado para ressuspender o extrato (no caso, o acetato de etila).

Bioautografia direta

Inicialmente, foi realizada uma análise do extrato bruto por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foram pipetadas 5µL das amostras colocadas em placas de sílica-

gel Whatman (SiO₂ x H₂O 20; 20 cm; G 60 F250nm). As placas foram imersa em solução de (Hexano / Acetato de Etila, 30% / 70%, v/v) que atuou como fase móvel. A revelação foi feita sob luz ultravioleta visualizando as manchas dos eluentes cromatográficos dos compostos dos extratos e calculou-se o fator de retardamento (Rf). Em seguida, as placas de CCD foram submetidos ao ensaio de bioautografia em uma fina camada de meio de cultura sabouroud e 10µL da solução de suspensão do microrganismo. Após a incubação, observou-se a formação dos halos de inibição. Para controle utilizou-se placa de sílica-gel nas mesmas condições empregadas no bioensaio, porém sem aplicação de amostra. A bioautografia direta foi realizada em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se, através do método de semeadura em placa de ágar, uma série de culturas puras em meio de cultura, resultando em um total de 45 bactérias, 3 leveduras e 35 fungos. Mas, dentre os microorganismos, destaca-se as bactérias devido à ocorrência de enorme variedade de tipos nutritivos e fisiológicos (versatilidade metabólica), excedendo a população de todos os outros grupos de microorganismos, tanto em número quanto em variedade.

A partir da cultura pura, realizou-se uma triagem das linhagens bacterianas, utilizando os extratos obtidos a partir da

cultura líquida. Dentre essas linhagens, a rizobactéria 73 obteve grande interesse devido à ação frente aos patógenos utilizados no teste (*Candida albicans*, *Microsporium gyparum* e *Trichophyton rubrum*).

Em seguida, procedeu-se a caracterização da bactéria 73, foram realizadas observações macroscópicas, microscópicas e bioquímica (conforme Quadro 01). Vale ressaltar que utilizando a chave dicotômica da ordem das Eubacteriales, adaptada da 7ª edição de Bergey's, verifica-se que a linhagem bacteriana não identificada pode ser incluída no grupo das Bacillaceae, e devido a formação de endósporos, essas linhagens foram identificadas do gênero *Bacillus*.

Quadro 01: Características macroscópicas, microscópicas e bioquímica da rizobactéria.

Cor	Branca
Superfície	Opaca
Densidade	Opaca
Consistência	Membranosa
Forma	Irregular
Margem	Ondulada
Elevação	Elevada
Forma	Bacilos
Comprimento	Longos
Largura	Grossos
Presença de endósporos	Presente
Coloração de Gram	Positivo
Catalase	Negativo
Citocromo - oxidase	Negativo

Fonte: O próprio autor

Devido a incerteza na identificação, foi realizado uma análise do

eletroforetograma de cada sequência gerado no sequenciador automático ABI377, após a busca de similaridade no banco de dados do GenBank através do programa BLASTn, a rizobactéria 73 foi identificada como *Bacillus cereus* (MRbS26).

A linhagem identificada como *Bacillus cereus* foi submetido ao crescimento líquido em uma cultura líquida. Depois do tempo de incubação no agitador tipo shaker, obteve-se uma coloração amarelo-escura, representando o aumento do número bacteriano e dos metabólitos secundários originados. Realizou-se uma extração líquido-líquido utilizando como solvente orgânico selecionado (acetato de etila) anteriormente devido ao seu ótimo desempenho na avaliação da atividade fúngica indicando uma maior eficiência na extração dos compostos antifúngicos frente aos patógenos testados.

Com o extrato bruto obtido, foram realizados testes de inibição para *Candida albicans*, *Microsporium gyparum* e *Trichophyton rubrum*. Observou-se uma ação inibitória discreta frente aos dois últimos patógenos (*Microsporium gyparum* e *Trichophyton rubrum*). Entretanto, observou-se uma ação inibitória bastante considerável frente à *Candida albicans*, verificou-se que o halo de inibição do extrato obtido do isolado de *Bacillus cereus* é de 26,0 mm. É importante salientar que o solvente orgânico puro (acetato de etila) foi injetado em poço e não apresentou uma inibição visível,

ênfatizando o potencial inibitório da amostra de extrato utilizado.

Comparando com outros extratos, observa-se que o halo de inibição do extrato obtido do isolado de *Bacillus cereus* frente à *Candida albicans* é muito significativo. AMANCIO *et al.* (2015) avaliou a ação dos extratos de araçazeiro verde, araçazeiro seco, goiabeira verde e goiabeira seco sobre *Candida albicans*, obtendo um diâmetro máximo dos halos de inibição de 16mm.

Na literatura, observa-se que o gênero *Bacillus* apresenta grande potencial de uso no controle biológico de diversos patógenos. Vieira-Júnior (2005) verificou que os extratos obtidos por uma linhagem de *Bacillus cereus* foi capaz de inibir o crescimento micelial de diversos patógenos testados. Paz (2010) verificou um efeito fungistático de nove isolados de *Bacillus* na cultura do mamoeiro. Lima *et al.* (2014) afirmou que isolados de *Bacillus* apresentaram potencial para inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Em seguida, foi realizada a análise do extrato bruto por cromatografia em camada delgada. A revelação foi feita sob luz ultravioleta visualizando as manchas dos eluentes cromatográficos dos compostos dos extratos. Observou-se a presença de três frações em uma placa de CCD de 7,0 x 2,0 cm (Figura 1).

Figura 01: Visualização da placa de CCD na câmara de luz ultravioleta



Fonte: O próprio autor

Por fim, após o período de incubação dos testes de bioautografia, observou-se a formação do halo de inibição na fração cujo fator de retardamento (Rf) é 0,43, identificando-a como a fração responsável pelo potencial inibitório frente ao patógeno testado (*Candida albicans*). Os resultados desse experimento dão indícios de que os isolados *Bacillus cereus* podem ser considerados fonte promissora de uma alternativa terapêutica para as infecções fúngicas, em especial a candidíase.

CONCLUSÃO

Com os resultados pode-se concluir que o *Bacillus cereus* (MRbS26) apresenta metabólitos secundários com potencial antifúngico e podem ser considerados fonte promissora de bioprospecção de novos fármacos. Tornando-se uma alternativa terapêutica, propiciando a síntese de um novo fármaco para o tratamento de infecções fúngicas, principalmente a candidíase. Deve salientar que devido a uma elevada incidência

da candidíase e agravada pelo aumento de resistência aos medicamentos amplamente utilizado na terapia antifúngica, deve-se buscar novos fármacos como alternativas terapêuticas para esta patologia.

Neste contexto, observou-se uma atividade inibitória significativa dos extratos frente à *Candida albicans*, que através da bioautografia, visualizou-se que fração (Rf 0,43) é a fração que obteve maior eficiência na inibição do patógeno. Porém, é necessária a realização de estudos mais minuciosos, principalmente objetivando a purificação de compostos químicos presente na fração responsável pela ação, para alcançar maior eficiência frente ao patógeno. Além disso, deve-se avaliar a viabilidade técnica e econômica de uma possível síntese de um fármaco com grande potencial frente à *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

AMANCIO, A.M. *et al.* Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *psidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 644-652, 2015

AUER C.G.; BETTIOL W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**, 1986.

CAMPOS SILVA, J.R. *et al.* Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CECHINEL FILHO, V, *et al.* R. A. Síntese de N-alquilfenilmaleimidás e N-alquilarilmaleimidás com atividade antifúngica. **Quím. Nova**, São Paulo: v.19, p. 590, 1996.

CELOTTO, A.C. *et al.* Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz. J. Microbiol.** n.4,v.34, p.339-340, 2003.

FAVEL, A. *et al.* *In Vitro* Antifungal activity of triterpenoid saponins. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 60, p. 50-53, 1994.

FERREIRA, P. H. C. Avaliação da atividade antifúngica do *Rosmarinus officinalis* frente à *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Health**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2012.

KHAN, R. *et al.* Antimicrobial Activity Of Fiver Herbal Extracts Against Muiti Drug Resistant (MRD) Strains Of Bacteria And Fungus Of Clinical Origin. **Molecules**, v.14, n.2, p.586-597, 2009.

KIRAZ, N.U.; YASEMIN, O.Z. A distribuição das espécies e suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Candida* de um hospital universitário na Turquia ao longo de um período de 5 anos. **Medical Mycology**, v.49, n.2, p.126-131, 2011.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 4, N. 2, p. 14, 2010.

LIMA, I.O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LIMA, O.D.R. *et al.* Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillu ssp.* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 57- 64, dez., 2014.

- MELO, F. M. P. **Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- NAKAMURA, S. *et al.* Steroidal Saponins and Pseudoalkaloid Oligoglycoside from Brazilian 22 Natural Medicine, "Fruta do Lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v.69, n.1, p.1565-1572, 2008.
- NARDIN M.E.; PELEGRI D.G.; MANIAS V.G. Etiological agents of dermatomycoses isolated in a hospital of Santa Fé City, Argentina. **Rev Argent Microbiol**, n. 38, p. 25-27, 2006.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, V. 70, p. 461-477, 2007.
- PERRY, N. B., FOSTER, L. M. Antiviral and Antifungal flavonoids, plus a triterpene, from *Hebe cupressoides*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 60, p. 491-492, 1994.
- PAZ, D. S. da. **Ação inibitória de extratos vegetais, óleo de nim, produtos abióticos e *Bacillus* sobre *Corynespora cassicola*, agente da mancha-alvo do mamoeiro**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.
- PINTO T.J.A., KANEKO T.M., OHARA M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.
- RAMASAMY K. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. **Phyther Res**, n. 24, p. 640-643, 2010.
- SILVA, A.C *et al.* Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1853 -1860, 2009.
- STARGARLIN J.R. *et al.* Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 11, 1999. p.6-21.
- TAKAHASHI, J.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quím. Nova**. V. 31. N. 7, p. 1807-1813, 2008.
- VIEIRA JUNIOR, J. R. **Procariontes residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2005. 146 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- XUE, H. *et al.* Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalotaxus mannii*. **Rec Nat Prod**. v. 6. n.1 p. 28-34, 2012.