

SAÚDE E AMBIENTE

V.8 • N.2 • 2020 - Fluxo Contínuo

ISSN Digital: 2316-3798

ISSN Impresso: 2316-3313

DOI: 10.17564/2316-3798.2020v8n2



POTENCIAL DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS CONTRA O FUNGO *CRYPTOCOCCUS GATTII*

POTENTIAL OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF ACTINOMICETES
AGAINST THE FUNGUS *CRYPTOCOCCUS GATTII*

POTENCIAL DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS
CONTRA EL HONGO *CRYPTOCOCCUS GATTII*

Suelem dos Santos Amaral¹

Ana Célia Rodrigues da Silva e Silva²

Luiz Alfredo Torres Sales³

Camila Silva Alves⁴

Rita de Cássia Mendonça de Miranda⁵

Luiz Claudio Silva Nascimento⁶

Matheus Silva Alves⁷

RESUMO

Actinomicetos são bactérias gram-positivas que apresentam crescimento filamentosos. Essas bactérias se destacam pela produção variada de substâncias bioativas que podem apresentar ação antimicrobiana, sendo muito utilizados na indústria farmacêutica para a produção de antimicrobiano. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de inibição contra *Cryptococcus gattii* a partir de actinomicetos isolados do solo da região de Balsas, estado do Maranhão. Para isolamento das bactérias, as amostras de solo foram sujeitas a diluições seriadas em meios de cultura convencionais, obtendo-se após um período, o crescimento de colônias correspondentes, identificadas e enumeradas. Para caracterização das espécies de actinomicetos isoladas, realizou-se a técnica de microcultivo, e para análise da ação antifúngica dessas bactérias, foram realizados ensaios de sensibilidade pela técnica em bloco de gelose frente ao fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Foram isoladas 10 cepas de actinomicetos, e dentre elas apenas três apresentaram a formação de halo de inibição com média de 38,1mm, 41,6mm e 40mm, indicando possível ação antifúngica. Para identificação das espécies de actinomicetos que apresentaram ação, realizou-se a técnica de microcultivo, onde foi possível observar espécies de *Streptomyces* e *Streptosporangium*. Portanto a pesquisa é de suma importância, uma vez que este fungo é causador da criptococose, patologia associada à saúde pública. Tendo em vista que os medicamentos sintéticos presentes no mercado vêm apresentando incapacidade de combater esses patógenos.

PALAVRAS-CHAVE

Isolamento, actinomicetos, sensibilidade, controle biológico, bioprospecção.

ABSTRACT

Actinomycetes are gram-positive bacteria that show filamentous growth. These bacteria are distinguished by the varied production of bioactive substances that can present antimicrobial action, being very used in the pharmaceutical industry for the production of antimicrobial. In this way, the objective of this work is to evaluate the inhibition potential against *Cryptococcus gattii* from actinomycetes isolated from the soil of the Balsas region, Maranhão state. For isolation of the bacteria, the soil samples were subjected to serial dilutions in conventional culture media, obtaining, after a period, the growth of corresponding colonies, identified and enumerated. For the characterization of the species of actinomycetes isolated, the microculture technique was performed, and for analysis of the antifungal action of these bacteria, sensitivity tests were carried out by the block agar technique against the fungus *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Ten strains were isolated among them, only three presented the formation of inhibition halo with a mean of 38.1mm, 41.6mm and 40mm, indicating possible antifungal action. In order to identify the species of actinomycetes that showed action, the microculture technique was used, where it was possible to observe species of *Streptomyces* and *Streptosporangium*. Therefore the research is of paramount importance, since this fungus causes cryptococcosis, a pathology associated with public health. Considering that the synthetic drugs present in the market have been unable to combat these pathogens.

KEYWORDS

Isolation, Actinomycetes, Sensitivity, Biological Control, Bioprospecting.

RESUMEN

Los actinomicetos son bacterias gram positivas que muestran un crecimiento filamentoso y se distinguen por la producción variada de sustancias bioactivas que pueden presentar una acción antimicrobiana, siendo muy utilizadas en la industria farmacéutica para la producción de antimicrobianos. De esta manera, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de inhibición contra *Cryptococcus gattii* de actinomicetos aislados del suelo de la región de Balsas, estado de Maranhão. Para el aislamiento de las bacterias, se hizo

diluições seriadas de las muestras de suelo, en medios de cultivo convencionales, obteniendo, después de un período, el crecimiento de las colonias correspondientes, identificadas y enumeradas. Para la caracterización de las especies de actinomicetos aislados, se realizó la técnica de microcultivo, y para el análisis de la acción antifúngica de estas bacterias, se realizaron pruebas de sensibilidad mediante la técnica del bloqueo de agar contra el hongo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Diez cepas fueron aisladas y, entre ellas, solo tres presentaron la formación de halo de inhibición con una media de 38,1 mm, 41,6 mm y 40 mm, lo que indica una posible acción antifúngica. Para identificar las especies de actinomicetos que mostraron acción, se utilizó la técnica de microcultivo, donde fue posible observar especies de *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Por lo tanto, la investigación es de suma importancia, ya que este hongo causa la criptococosis, una patología asociada con la salud pública. Teniendo en cuenta que las drogas sintéticas presentes en el mercado no han podido combatir estos patógenos.

PALABRAS CLAVE

Aislamiento, actinomicetos, sensibilidad, control biológico, bioprospección.

1 INTRODUÇÃO

Os Actinomicetos são bactérias que apresentam em sua estrutura uma membrana fosfolipídica e camadas espessas de peptidoglicano, caracterizando-as como Gram-positivas, contendo ainda em seu genoma altas concentrações de citosina e guanina. Durante algum tempo essas bactérias foram caracterizadas por alguns pesquisadores como fungo, devido ao seu crescimento filamentososo, além da produção de micélio de substratos, micélio aéreo e esporos, o que confere a esta classe resistência e sobrevivência em diversos habitats, como água, animais, pedras, plantação e principalmente o solo (HOLT *et al.*, 1994; SATHEEJA; JEUMAR, 2011). Dentre as espécies mais comumente isoladas, encontra-se o *Streptomyces*, onde, segundo Kennedy (1999), 30% da microbiota do solo corresponde a actinomicetos.

Essas bactérias se destacam pela produção variada de metabólitos secundários, apresentando ação que auxiliam no combate de patógenos, bactérias e fungos. São microrganismos endofíticos, podendo ser a maioria aeróbia, apresentando crescimento relativamente lento.

Destacam-se pela habilidade em produzir compostos bioativos, como a produção de sistemas enzimáticos, síntese de substâncias e antagonismo a outros microrganismos, sendo realizadas atividades como competição por espaço, lesão e/ou destruição de outros (KENNEDY,1999; LACAZ *et al.*, 2002). Devido a isso, essas bactérias são atualmente muito utilizadas na indústria farmacêutica na produção de antibióticos e antifúngicos, com o intuito de combater patógenos, bactérias e fungos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; MAHESHWARI *et al.*, 2010).

Infecções fúngicas vêm mantendo um aumento significativo, sendo causadas por patógenos que utilizam os seres humanos como hospedeiros. Essas infecções são classificadas em primárias, que se

desenvolvem em imunocompetentes e oportunistas, manifestando-se em indivíduos imunocomprometidos (REVANKAR, 2017)

O *Cryptococcus gattii* é uma levedura encapsulada, de caráter patogênico limitado a certas regiões tropicais e subtropicais, havendo relatos de isolamento desses fungos em espécies de eucalipto e mais recentemente em ocos de oiti (LAZÉRA *et al.*, 1998; PASSONI, 1999). Esta espécie causa doenças em vários mamíferos, a exemplo destaca-se a criptococose, considerada uma doença que atinge tanto imunossuprimidos como imunocompetentes. É adquirida através da inalação do agente, que em humanos pode causar infecção pulmonar frequentemente fatal, além do caso clínico mais grave quando esta atinge o sistema nervoso central, fazendo com que a meningite criptocócica se torne a principal manifestação clínica (KWON-CHUNG *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Os fatores predisponentes que podem levar à infecção criptocócica podem ser desenvolvidos a partir de imunodeficiência celular, como por exemplo, pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), uso de imunossupressores em transplantados, corticoterapia leucemias e outras doenças hematológicas. Outros fatores são a diabetes e cirrose hepática (LEIMANN; KOIFMAN, 2008). Devido a isso, as infecções requerem, geralmente, longos períodos de terapia com antifúngicos, e esses esquemas terapêuticos podem vir a promover a resistência desses patógenos a esta classe de medicamentos.

Em virtude disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de inibição do fungo *Cryptococcus gattii* a partir de actinomicetos isolados do solo em um município do estado do Maranhão.

2 MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO

Para a técnica de isolamento de actinomicetos, foi elaborada uma coleta de 10 pontos equidistantes em cultura de soja localizada em Balsas-MA, Brasil. Em seguida, coletou-se 1g de amostra do solo de cada ponto e obteve-se uma mistura composta de 10 g. Tal amostra foi suspendida em 90 mL de soro fisiológico 0,9% e homogeneizado em agitador de frascos Erlenmeyer. Após 1 hora em agitação, as amostras de solo foram submetidas a diluições seriadas decimais até o fator de diluição 10^{-5} .

Em seguida, alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em triplicata na superfície de placas de Petri por meio do espalhamento com alça de Drigalski. Os meios de cultura utilizados foram: *Ágar-Sabouraud-Dextrose* (SAB), *Ágar-Batata-Dextrose* (BDA) e *Ágar-Czapek-Dox* (CZA). As placas foram incubadas a 28°C em estufa de B.O.D por 5 dias. Após a incubação, as amostras foram selecionadas e purificadas de acordo com a sua estrutura morfológica de crescimento.

2.2 TESTE DE GELOSE

O teste de sensibilidade em meio sólido foi realizado com o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Para o teste de gelose (ICHIKAWA *et al.*, 1971), utilizou-se 1 mL da suspensão de cada patógeno, diluí-

dos em escala de MacFarland e semeados em placas, contendo meio de cultura Ágar Müller-Hinton. Após este, retirou-se as colônias de actinomicetos cortadas de forma esférica, em blocos (discos com micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro) e adicionadas em triplicata à placa, contendo o patógeno. Em seguida, as amostras foram armazenadas em estufa B.O.D a 28°C por um período de 36 horas, posteriormente feita a análise da ação dos actinomicetos por meio da formação do halo de inibição, sendo os diâmetros medidos e retirados o desvio padrão.

2.3 MICROCULTIVO

Para a análise das estruturas morfológicas, foram preparadas placas de cultura com o meio *Ágar-Batata-Dextrose* (BDA). Por conseguinte, foi colocado nas placas os blocos de gelose das cepas de interesse, juntamente com uma lamínula sobreposta, utilizando-se a metodologia adaptada de Koneman e colaboradores (2001). As placas foram incubadas a 28°C em estufa de B.O.D por 5 dias. Após o período de incubação, a lamínula foi corada com solução azul de lactofenol e visualizada no microscópio pela objetiva x100.

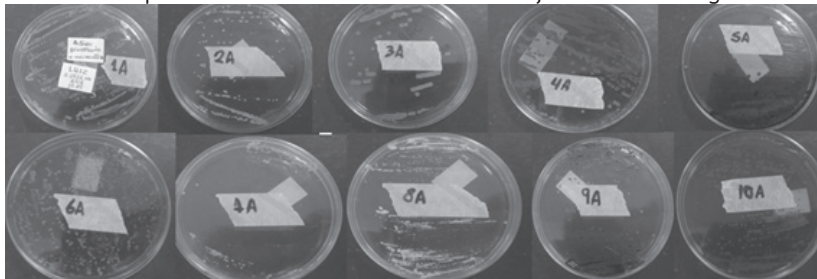
3 RESULTADOS

Foram testadas 10 isolados diferentes de actinomicetos obtidos do solo de cultivo de soja que faz uso de agrotóxicos. Esses microrganismos isolados foram testados contra o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065.

3.1 ISOLAMENTO

A amostra de isolados do solo apresentou uma grande diversidade de microrganismo, fazendo-se necessário o uso de meios de cultura específicos para isolar apenas colônias de actinomicetos. Com a purificação foram obtidas dez cepas de actinomicetos. Estes apresentando diversidade quanto à produção de pigmentos e estruturas (FIGURA 1).

Figura 1 – Actinomicetos purificados do solo de cultivo de soja com uso de agrotóxicos



Fonte: Dados da pesquisa

3.2 MICROCULTIVO

No teste do microcultivo, dos dez isolados conseguimos identificar setes gêneros que foram: 1A-*Streptosporangium* sp; 3A-*Streptomyces* sp; 5A-*Streptoverticillium* sp.; 6A-*Streptomyces* sp; 8A-*Streptosporangium* sp.; 9A-*Streptoverticillium* sp. 10A-*Streptomyces* sp. (Tabela 1). As demais não obtiveram crescimento.

Tabela 1 – Gêneros de Actinomicetos identificadas por meio da técnica de microcultivo

Identificação	Gênero
AC1	<i>Streptosporangium</i> sp.
AC3	<i>Streptomyces</i> sp.
AC5	<i>Streptoverticillium</i> sp.
AC6	<i>Streptomyces</i> sp.
AC8	<i>Streptosporangium</i> sp.
AC9	<i>Streptoverticillium</i> sp.
AC10	<i>Streptomyces</i> sp.

Legenda: (AC) Actinomicetos

Fonte: Dados da pesquisa

3.3 TESTE DE GELOSE

Os actinomicetos isolados e identificados foram submetidos ao teste de gelose, com o intuito de verificar se os metabolitos produzidos por esses microrganismos são capazes de inibir o crescimento do fungo *Cryptococcus gattii*, obtendo-se resultados qualitativos (TABELA 2).

Tabela 2 – Perfil do potencial de inibição das cepas de actinomicetos sobre o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065

	AC1	AC2	AC3	AC5	AC6	AC8	AC9	AC10
CG24065	+	-	+	-	+	-	-	-

(+) apresentou inibição; (-) ausência de inibição; (AC) Actinomicetos; (CG24065) *Cryptococcus gattii* ATCC

Fonte: Dados da pesquisa

Para as estripes de actinomicetos que apresentaram formação de halo de inibição foram realizadas medidas deles, onde as médias de diâmetro dos halos apresentaram os seguintes valores: AC1 de 38,1 mm, AC3 de 41,6 mm e AC6 de 40,0 mm, como apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Formação dos halos de inibição medidos em diâmetro (mm), média aritmética e desvio padrão para o fungo *Cryptococcus gattii*

	Média Aritmética	Desvio Padrão
AC1	38,1	± 2.88
AC3	41,6	± 2.88
AC6	40	0.0

Legenda: (+/-) Margem de erro para mais e menos; (AC) Actinomicetos.

Fonte: Dados da pesquisa

4 DISCUSSÃO

Actinomicetos vêm se apresentando como uma importante fonte de substâncias bioativas, principalmente por sua ação antimicrobiana, acarretando tanto no combate a microrganismos que durante as últimas décadas apresentaram resistência aos antibióticos presentes no mercado, quanto a sua utilização para a promoção à saúde pública (ASOLKAR *et al.*, 2010). A diversidade química e mecanicista do antibacteriano natural tem proporcionado produtos privilegiados para o desenvolvimento de medicamentos (LOPES *et al.*, 2011).

Streptomyces sp. e *Streptosporangium sp.* fazem parte do Filo dos Actinomicetos. De acordo com alguns autores, o *Streptomyces* é um microrganismo com grande potencial de produção de metabólitos com ação antimicrobiana, no qual já foram isolados e descritos por pesquisadores.

Segundo Miyachi (2012), em estudos realizados com actinomicetos isolados do rizosfera de Araucária, obteve-se um potencial de inibição de cerca de 25% no controle da atividade do fungo *Fusarium sp.* Silva (2014) avaliou a atividade antagonista do gênero *Streptomyces sp.* no biocontrole do fungo *Botrytis cinerea*, em cerca de 72% no período de sete dias. Podemos citar os metabólitos envolvidos a Platensimicina e Platencina (WANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007), Lucensimycina (SINGH *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2008), Okilactomycins (GENILLOUD, 2017), Krysinomycin (BROWN *et al.*, 2014) todos já testados e comprovados sua ação antimicrobiana e, portanto, usados como antibióticos.

Além da ação bactericida e bacteriostática desses metabólitos, em estudos com fungos também foram verificados a ação antifúngica com os compostos 210 A (WU *et al.*, 2009) e a fungicromina (WEI *et al.*, 2011). Esses trabalhos ajudam a corroborar os nossos resultados que apresentaram ação metabólica de inibição contra a estirpe de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065. Não há ainda estudos anteriores que tenham realizados ensaios com esses metabólitos. Sendo necessário que se realizem mais estudo para que se possam isolar esses componentes e identificar a sua atuação no *Cryptococcus gattii*, a fim de combater esse perigoso patógeno que está disperso pelo meio ambiente, podendo vir a ser letal para os humanos.

Trabalhos realizados com *Streptosporangium sp.*, isolados de solos apresentaram atividade antifúngica e essa atividade está relacionada com a iodinina, que curiosamente é produzido apenas por essa espécie de actinomicetos, onde nenhum outro é capaz de produzir esse composto (LAURSEN; NIELSEN, 2004).

Assim, o trabalho de Laursen e Nielsen ajudam a confirmar nossos achados e permitem nos direcionar na seleção do bioativo que está associado à ação fungicida dos *Streptosporangium sp.*, assim apresentando a iodina como possível agente fungicida. Porém são necessários mais estudos, tais como isolamentos e identificação dessas substâncias para obtenção de resultados que venham confirmar o mesmo efeito a partir da ação isolada.

5 CONCLUSÃO

Portanto, neste trabalho iniciamos os estudos de ação fungicidas dos metabólitos contra o fungo *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, fazendo-se necessário estudos mais aprofundados que busquem identificar as biomoléculas capazes de minimizar o efeito desse patógeno e assim promover a saúde coletiva, aumentando o arsenal de combate aos microrganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

ASOLKAR, R. N. *et al.* Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **J. Antibiot.**, v. 63, n. 1, p. 37-39, 2010.

BROWN, D. G. *et al.* New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 2, p. 413-418, 2014.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, n. 10, p. 1203-1232, 2017.

HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

ICHIKAWA, T. *et al.* A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agr. Ecosyst. Environ.**, v. 74, n. 1-3, p. 65-76, 1999

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med. Mycol.**, v. 38, suppl. 1, p. 205-213, 2000.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 3, p. 1663-1686, 2004.

LAZÉRA, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 36, n.2, p. 119-122, 1998.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, 2008

LOPES, A. A. *et al.* Quando os microrganismos salvam vidas: seres diminutos a serviço da produção de medicamentos. **Ciên. Hoje**, v. 286, p. 30-35, 2011.

MAHESHWARI, D. K. *et al.* **Industrial exploitation of microorganisms**. New Delhi: I.K. International Publishing House. 2010.

MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de Araucaria angustifolia**. 2012. 105f. Tese (Doutorado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p. 77-81, 1999.

REVANKAR, S. G. **Visão geral das infecções fúngicas**. Manual MSD - Versão para Profissionais de Saúde. 2017. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doencas-infecciosas/fungos>. Acesso em: 1 maio 2019.

SILVA, V. M. **Atividade antagônica de Actinobactérias contra Botrytis sp.** 2014. 37f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SINGH, S. B. *et al.* Discovery of lucensimycins A and B from *Streptomyces lucensis* MA7349 using anantisens strategy. **Org. Lett.**, v. 8, n. 24, p. 5449-5452, 2006.

SINGH, S.B. *et al.* Discovery and antibacterial activity of lucensimycin C from *Streptomyces lucensis*.

Tetrahedron Lett., v. 49, n. 16, p. 2616-2619, 2008.

WANG, J. *et al.* Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 358-361, 2006.

WANG, J. *et al.* Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, n. 18, p. 7612-7616, 2007.

WEI, S.J. *et al.* Studies on the isolation, identification and active tyofanti-Fusarium oxysporum secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. 702. **Acta Agric. Univer. Jiangxi**, v. 33, n. 5, p. 982-986, 2011.

WU, X. *et al.* A novel antibiotic produced by *Streptomyces noursei* Da07210. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 1, p. 109-112, 2009.

1 Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Ceuma.
E-mail: suellem_8@hotmail.com

2 Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Ceuma.
E-mail: anaceliar2016@hotmail.com

3 Acadêmico do curso de biomedicina, Universidade Ceuma. E-mail: luizalfredo.torressales@gmail.com

4 Nutricionista colaboradora.
E-mail: camilasilva.alves@gmail.com

5 Professora da Universidade Ceuma.
E-mail: rita.miranda@ceuma.br

6 Professor da Universidade Ceuma.
E-mail: luiscn.silva@ceuma.br

7 Professor da Universidade Ceuma.
E-mail: Matheus.alves@ceuma.br

Recebido em: 30 de Março de 2018

Avaliado em: 5 de Maio de 2018

Aceito em: 10 de Agosto de 2018



A autenticidade desse artigo pode ser conferida no site <https://periodicos.set.edu.br>



Este artigo é licenciado na modalidade acesso abertosob a Atribuição-Compartilha Igual CC BY-SA