

# Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos

Thompson Lopes de Oliveira,<sup>\*1</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima,<sup>2</sup> Ivone Antonia de Souza,<sup>3</sup> Luis Conrado Z. Cornejo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, 50740-521 Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco s/n, Cidade Universitária, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521 Recife-PE, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Independência 1027, Santiago, Chile.

**RESUMO:** Foram coletadas sessenta e oito amostras em diferentes solos paraibanos, com o isolamento de quarenta e nove cepas de *Streptomyces* spp. Após triagem antimicrobiana, por meio da técnica de difusão em meio sólido com blocos de agar, foram preparados os extratos dos microrganismos produtores de metabólitos bioativos, respectivamente cepas SP1 e SP3, e em seguida avaliados quanto a atividade antifúngica frente a espécies de fungos filamentosos de origem clínica e ATCC. O antagonismo foi determinado através dos ensaios de difusão com discos em meio sólido, microdiluição e cinética de morte microbiana. Os halos de inibição obtidos a partir dos extratos Sp-1 e Sp-3 apresentaram efeito antagonístico com valores superiores aos halos de inibição promovidos pela droga controle, frequentemente utilizada na terapêutica antifúngica. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas na microdiluição foram expressivos com valores fungicidas variando entre 10 mg e 0,078125 mg. Na cinética de morte microbiana, as atividades dos extratos Sp-1 e Sp-3 resultaram em dados estatisticamente significativos frente às cepas testes.

**Unitermos:** *Streptomyces*, extratos, atividade antifúngica, cinética.

**ABSTRACT:** "Antifungal activity and kinetics of microbial death of extracts obtained from *Streptomyces* spp. isolated from paraibano soils". Sixty eight samples were collected in different soils of Paraíba, with the isolation of forty nine strains of *Streptomyces* spp. After screening antimicrobial followed the method of diffusion in solid medium with agar block, the extracts were prepared from microorganism producers of bioactive metabolites, respectively strains SP1 and SP3, and then evaluated for antifungal activity against strains of filamentous fungi of clinical origin and ATCC. The antagonism was determined through testing of diffusion disc in solid medium, microdilution and kinetics of microbial death. The inhibition zones obtained from extracts of Sp-1 and Sp-3 showed antagonistic effect with values greater than the halos of inhibition promoted by the drug control, often used in antifungal therapy. The results of minimum inhibitory concentrations in microdilution were significant with fungicide values ranging between 10 mg and 0.078125 mg. In the kinetics of microbial death, the activities of the extracts Sp-1 and Sp-3 resulted in statistically significant data front of strains tested.

**Keywords:** *Streptomyces*, extract, antifungal activity, kinetics.

## INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado e prolongado de drogas antimicrobianas sintéticas tem levado à seleção de microrganismos patogênicos cada vez mais resistentes, com perfis de multiresistência. Este problema é intensificado em países como o Brasil, onde a população tem por

hábito a automedicação, utilizando de maneira indevida os antibióticos, em dosagens e posologia (Tresoldi et al., 2000). Em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada às infecções fúngicas e bacterianas, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos naturais ou sintéticos, que sejam menos tóxicos e apresentem atividade contra

cepas de microrganismos resistentes (Lima et al., 1975).

Dessa forma, a pesquisa com organismos produtores de metabólitos ativos com efeito antagonístico contra cepas de fungos e bactérias está sendo cada vez mais difundida em todo o mundo. Cerca de 84% dos antibióticos de origem natural encontrados são produzidos por microrganismos do solo em especial os *Streptomyces* spp. com resultados extremamente eficazes (Sanches-Marroquin, 1958). Os *Streptomyces*, dentre os *Actinomycetes*, lideram a produção de antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas, enquadradas em uma diversidade de classes, como: aminoglicosídeo, macrolídeo, ansamacrolídeo, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídeo, antraciclina, tetraciclina, nucleosídeo, polieno e quinona (Garcia-Quintana, 1997).

Desta forma, a utilização da ecologia na prospecção de microrganismos de interesse biotecnológico isolados de solos e de plantas medicinais, tornou-se mais frequente e vem mostrando a descoberta de novos metabólitos bioativos (Strobel & Daisy, 2003; Wiyakrutta et al., 2004; Li et al., 2005).

Portanto, julgou-se oportuno a realização desta pesquisa com objetivo de avaliar a capacidade de antagonismo através da produção de metabólitos bioativos pelas cepas nativas de *Streptomyces* spp isoladas de solo paraibano e cepas fúngicas de origem clínica e ATCC.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras e isolamento de colônias de *Streptomyces* spp

Foram coletadas sessenta e oito amostras de solo do leito dos principais rios que formam as bacias hidrográficas no Estado da Paraíba, distribuídos nas seguintes mesorregiões: Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano. Utilizando-se recipientes estéreis retirou-se cerca de 300 g de amostra do solo entre 1-9 cm de profundidade. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir de 10 g de cada amostra homogeneizada até 10<sup>-7</sup> diluição em solução fisiológica estéril. Após 15 min de agitação em vortex, foram semeadas as três últimas diluições em alíquotas, 0,1 mL do sobrenadante em meio de cultivo Kuster-Willians. Posterior a incubação a 28 °C por 5 d, as colônias com características de *Streptomyces* foram isoladas, e identificadas por meio de microcultivo, testes fisiológicos e ensaios citoquímicos (Serrano & Sandoval, 1992; Garcia-Quintana, 1997).

### Preparação dos extratos a partir dos *Streptomyces*

Após triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de agar (Ichikawa et al., 1971), as cepas SP1 e SP3 apresentaram os melhores resultados entre todas e seguiram na realização dos testes

frente às espécies fúngicas. As linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2 e incubadas em estufa BOD a 30 °C por 5 d. Após incubação, blocos de gelose (6 mm) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio ISP-2. Em seguida, iniciou-se incubação sob agitação (180 rpm), a 28 °C por 48 h. Posteriormente, 10% (v/v) deste pré-inóculo para cada linhagem foi transferido para Fernbach, contendo cada 300 mL do meio ISP-2 e cultivados por 48 h sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após fermentação foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min para a separação do líquido fermentado da massa celular.

Para a extração dos princípios ativos de cada líquido fermentado foi utilizado como solvente o etanol. Utilizou-se uma proporção de 1:2 dos líquidos fermentados, seguido da agitação durante 20 min em *shaker*. Foi realizada a separação das fases, uma orgânica composta pelo solvente com o princípio ativo extraído, e outra aquosa que consistiu na fase aquosa do líquido esgotado. Em seguida, as fases com os princípios ativos foram concentradas em evaporador rotatório, e mantidas em dessecador.

### Microrganismos e meios

As linhagens selecionadas para a realização dos testes de antagonismo pós-triagem antimicrobiana foram o *Aspergillus niger* LM 05, *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640, *Trichophyton rubrum* ATCC 1683 e *Trichophyton inkin* LM 067. As espécies foram mantidas em meio Sabouraud dextrose (DIFCO) por 14 d. a temperatura ambiente.

### Ensaio de atividade antimicrobiana

Foram preparados inóculos em solução salina estéril a 0,89% das linhagens testes ajustadas na escala de Mc Farland (01 x 10<sup>8</sup> UFC/mL), mantidas a temperatura ambiente. A atividade inibitória foi verificada pelas técnicas de difusão com discos em meio sólido (Bauer et al., 1966) e microdiluição (Nccls, 2002). No ensaio de difusão com discos, foi adicionado em uma placa de Petri estéril 1 mL de cada microrganismo-teste, seguido de 20 mL do meio Sabouraud dextrose fundido a 45 °C. Após solidificação, foram embebidos discos de papel de filtro com 30 µL de cada extrato em uma concentração de 10 mg/mL e colocados sobre a superfície do meio de cultura contendo os microrganismos testes. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 14 d. Após incubação os halos foram medidos e comparados com a droga controle, cetoconazol 50 µg/mL. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi realizada através da microdiluição, em placas de ELISA com noventa e seis poços estéreis. Foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud dextrose nos orifícios das placas, exceto na linha dez. Em seguida, foram dispensados 100

$\mu\text{L}$  de cada extrato em cada placa em uma concentração de 20 mg/mL nas cavidades da primeira linha. Seguindo o processo de diluição seriada, foram retirados 100  $\mu\text{L}$  da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensados 10  $\mu\text{L}$  do inóculo correspondente a cada cepa ensaiada. A linha onze foi reservada para o controle negativo com o caldo e a linha doze para o controle positivo com a droga cetoconazol 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato, incubados a temperatura ambiente por até 14 d. As leituras de determinação da CIM dos extratos Sp-1 e Sp-3, sobre as cepas testes, foram realizadas através do método visual, observando a formação ou não do aglomerado celular, considerando como CIM a menor concentração do produto em teste.

### Determinação da cinética de morte microbiana

O estudo da interferência das concentrações inibitórias mínimas dos extratos Sp-1 e Sp-3 sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado através da avaliação do crescimento radial das colônias em milímetros dos fungos filamentosos em intervalos de (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 d) em triplicata. Inicialmente, inoculou-se em placas de Petri estéreis 9 mL de meio Sabouraud acrescido de 1 mL de cada extrato em concentrações estabelecidas a partir do valor da CIM, homogeneizando até resfriamento. Em seguida, retiraram-se fragmentos de aproximadamente 2 mm de cada cepa fúngica ensaiada, colocando-os no centro da placa, incubando a temperatura ambiente por 14 d. No controle positivo foi utilizado 9 mL do meio + 1 mL de cetoconazol na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o controle negativo 9 mL do meio + 1 mL de salina estéril (Thyagara & Hosono, 1996; Adam et al., 1998; Daferera et al., 2000; Rasooli & Mirmostafa, 2002).

### Análise estatística

Dados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA-Bonferroni, e considerados significativos com  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos resultados da atividade antifúngica através do teste de difusão com discos em meio sólido o extrato Sp-1 apresentou inibição fúngica com halos entre 21-31 mm frente às espécies testes. O extrato Sp-3 apresentou efeito antagonico com halos de inibição superior ao extrato Sp-1, 24 mm contra o *T. rubrum* ATCC 1683 e 35 mm frente ao *A. fumigatus* ATCC 0406. Na Tabela 1 pode-se observar todos estes dados, bem como, os valores inibitórios da droga controle, inferior aos extratos testados, droga esta, comumente utilizada na terapia antifúngica. Os resultados apresentados pelo efeito dos extratos são relevantes e podem ser

comparados com outras literaturas que apresentam estudos realizados com cepas nativas de *Streptomyces* spp., com atividade antifúngica, a partir de solos no Brasil (Schlingmann et al., 1999; Bachiega et al., 2005).

Na Tabela 2 observa-se os dados de inibição em concentrações diferenciadas dos extratos Sp-1 e Sp-3 frente as amostras de fungos filamentosos. Na concentração inibitória mínima (CIM) de 0,078125 mg os extratos Sp-3 e Sp-1 apresentaram o mesmo resultado frente à cepa de *T. inkin* LM 067. Na concentração inibitória mínima (CIM) de 0,15625 mg o extrato Sp-1 mostrou-se eficaz em seu efeito antagonico contra o *A. niger* LM 05, *T. inkin* LM 067 e *A. fumigatus* ATCC 0406. O Sp-3 inibiu em mesma concentração as espécies *A. niger* LM 05, *T. inkin* LM 067 e *T. rubrum* ATCC 1683. Estes dados de inibição são corroborados por outras literaturas que também realizaram pesquisa de novos compostos antimicrobianos através de triagem clássica de produtos naturais (Groll et al., 1998; Ujikawa, 2003). Na microdiluição, o grupo controle sem droga inibitória apresentou o resultado esperado com crescimento para todas as espécies, e o controle com a droga antifúngica padrão cetoconazol 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inibiu o crescimento das cepas *T. inkin* LM 067 e *A. fumigatus* ATCC 0406.

No Gráfico 1 observam-se as curvas da cinética de morte para as duas espécies do gênero *Aspergillus*, destacando o relevante efeito antifúngico dos extratos Sp-1 e Sp-3. Na análise entre o controle e extratos todos os resultados foram significativos com redução do crescimento micelial dos fungos ( $p < 0,05$ ). Na análise controle e cetoconazol, a inibição da droga não foi significativa no ensaio com a cepa *A. fumigatus* ATCC 0406. No Gráfico 2 a inibição do crescimento micelial foi significativo para a cepa ensaiada *T. inkin* LM 067 com valores ( $p < 0,01$ ), na relação entre controle e extratos e controle e cetoconazol. Alguns trabalhos vêm explorando o potencial de substâncias bioativas extraídas de plantas e de microorganismos contra o crescimento micelial de fungos patogênicos e outros microrganismos. Salvagni et al. (2008), avaliou a atividade antibacteriana a partir de extratos de *Myrtus communis* L. frente a cepas Gram positivas e Gram negativas. Moreira (2006), determinou a cinética de algumas substâncias bioativas contra fungos dematiáceos, *C. cladosporioides* e *F. compacta*, observando efeito positivo contra o crescimento radial ao longo de 14 d de exposição. Sharma & Tripatti (2006), observaram que o óleo de *Citrus sinensis* na concentração de 3,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial do *A. niger* após 7 d de exposição. Pode-se inferir que os extratos obtidos a partir das cepas nativas de *Streptomyces* spp de solos paraibanos apresentam-se notáveis quanto à produção de metabólitos bioativos capazes de inibir o crescimento de cepas fúngicas patogênicas, apresentando-se como uma nova rota na busca por novas drogas antimicrobianas.

**Tabela 1.** Atividade antifúngica dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp contra fungos filamentosos.

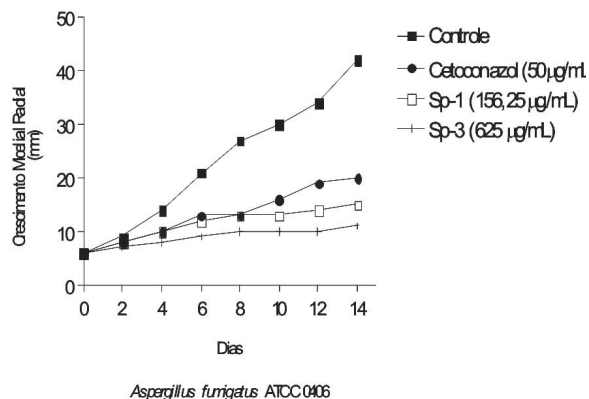
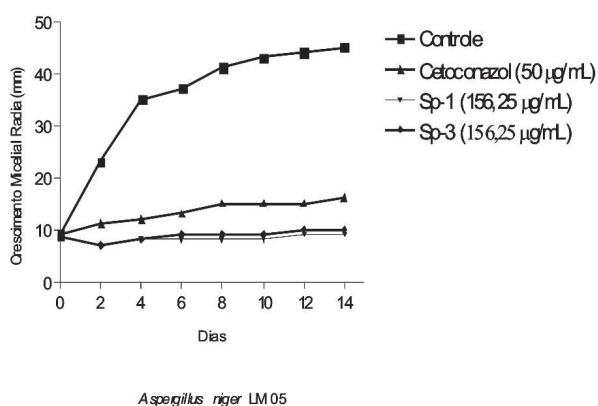
Espécies fúngicas	Método de difusão com discos em meio sólido (halos em mm)		
	Extrato Sp-1	Extrato Sp-3	Cetoconazol (50 µg/mL)
<i>A. niger</i> LM 05	24	29	20
<i>T. inkin</i> LM 067	25	31	19
<i>A. fumigatus</i> ATCC 0406	31	35	21
<i>T. rubrum</i> ATCC 1683	21	24	20

ATCC: America Type Culture Collection, LM: Laboratório de Micologia

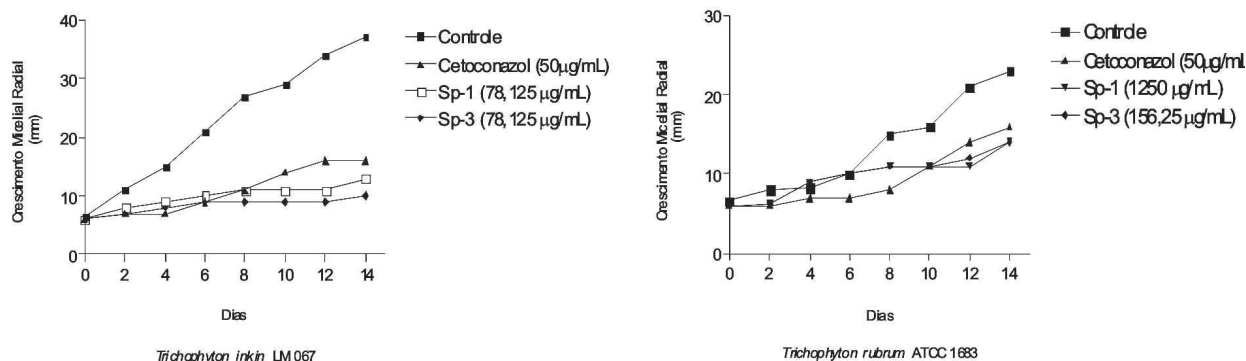
**Tabela 2.** Ensaio antifúngico em placas de microdiluição dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp contra fungos filamentosos.

Fungos Filamentosos	<i>Aspergillus niger</i> LM 05	<i>Aspergillus niger</i> LM 05	<i>Trichophyton inkin</i> LM 067	<i>Trichophyton inkin</i> LM 067	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 0406	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 0406	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1683	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1683
	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3
10,0	-	-	-	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25	-	-	-	-	-	-	-	-
0,625	-	-	-	-	-	-	+	-
0,31250	-	-	-	-	-	+	+	-
0,15625	-	-	-	-	-	+	+	-
0,078125	+	+	-	-	+	+	+	+
Controle*	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle+ Antifúngico**	+	+	-	-	-	-	+	+

\*\*Padrão cetoconazol 50 µg/mL; \*Caldo Sabouraud + microrganismo; Sp-1 e Sp-3: Extratos secos etanólicos; ATCC: America Type Culture Collection; LM: Laboratório de Micologia; (-) Ausência de crescimento microbiano; (+) Crescimento microbiano



**Figura 1.** Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* LM 05 e *A. fumigatus* ATCC 0406. ANOVA-Bonferronis (p < 0,05).



**Figura 2.** Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga Cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *T. inki* LM 067 e *T. rubrum* ATCC 1683. ANOVA - Bonferronis com ( $p < 0,01$ ), para o *T. inki* LM 067.

## REFERÊNCIAS

- Adam K, Sivropoulou A, Kokkni S, Lnaras T, Arsenakis M 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J Agr Food Chem* 46: 1739-1745.
- Bachiega GL, Vilegas W, Ujikawa K 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Rev Cienc Farm Basica Apl* 26: 29-37.
- Bauer AW, Kirby MDK, Sheries JC, Truck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agr Food Chem* 48: 2576-2581.
- Garcia-Quitana H, Zaror CL, Leiva P.S 1997. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev Med Chile* 125: 1157-1164.
- Groll AH, Delucca AJ, Walsh TJ 1998. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol* 6: 117-124.
- Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A 1971. Improvement of kasugamycin-Producing strain by the agar piece method and theprototroph method. *Folia Microbiol* 16: 218-224.
- Li H, Qing C, Zhang Y, Zhao Z 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World J Microb Biot* 21: 1515-1519.
- Lima OG, Viana SP, Carvalho JP, 1975. Menadione and its stimulant effect on the growth of animals. *Rev Inst Antibiot* 14: 29-38.
- Moreira ACP 2006. Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre fungos dematiáceos. Paraíba, 94p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.
- NCCLS 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. *Nccls* 17: Document m 27-A2.
- Rasooli I, Mirmosfata SA 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oil. *Fitoterapia* 73: 244-250.
- Salvagnni LE, Oliveira JRS, Santos LE, Pietro RCLR 2008. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L (Myrtaceae). *Rev Bras Farmacogn* 18: 241-244.
- Sanches-Marroquin A 1958. *Streptomyces* de amplio espectro antimicrobiano aislados de suelos de Brasil. *Rev Inst Antibiot* 1: 53-63.
- Serrano JA, Sandoval H 1992. *Tecnicas para el aislamiento y diagnóstico de los Actinomycetales*, Manual de Laboratorio. Valdivia: Facultad de Medicina UAL.
- Scharma N, Tripathi A 2006. Effects of Citrus (L) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol* 47: 9-17.
- Schlingmann G, Milne L, Bordes DB, Carter GT 1999. Strevertenes, antifungal pentene macrolides produced by *Streptoverticillium* LL-30F848. *Tetrahedron* 55: 5977-5990.
- Strobel GA, Daisy B 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol R* 67: 491-502.
- Thyagara N, Hosono A 1996. Effect of spice extract on fungal inhibition. *Lebensm wiss technol* 29: 286-288.
- Tresoldi AT, Barison EM, Pereira RM, Padoveze MC, Trabasso P 2000. Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in a pediatric nursery. *J Pediatr* 4: 275-286.
- Ujikawa K 2003. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Braz J Pharm Sci* 39: 149-158.
- Wiyakrutta S, Riubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from the medicinal plants. *World J Microb Biot* 20: 265-272.