

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS CONTRA

Staphylococcus aureus ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Antimicrobial action of extracts produced from filamentous fungi against Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis

Resumo:

O objetivo desse estudo foi testar a ação antimicrobiana de extratos produzidos com fungos filamentosos, contra estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos com mastite. Foram utilizados os fungos *Penicillium roqueforti* ATCC 40074 e *Penicillium camemberti*, em dois meios sólidos diferentes. Os extratos produzidos, foram testados frente as estirpes de *S. aureus* e aquelas que apresentaram maior sensibilidade foram submetidas a um novo teste com discos de antimicrobianos comerciais. Os resultados desse experimento mostraram que os extratos produzidos com o *P. roqueforti* não demonstraram atividade antimicrobiana nas estirpes testadas, enquanto que os produzidos com o *P. camemberti* no substrato de aveia com coco e no substrato de trigo com castanha do Pará inibiram 30% e 40% das estirpes, respectivamente. Os antibióticos mais eficazes frente as cepas foi o *Meropenem* com halo de 27,2. A penicilina apresentou menor halo, 3mm.

Abstract:

The objective of this study was to test the antimicrobial action of extracts produced with filamentous fungi against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. The fungi *Penicillium roqueforti* ATCC 40074 and *Penicillium camemberti* were used in two different solid media. The extracts produced were tested against the strains of *S. aureus* and those with the highest sensitivity were submitted to a new test with commercial antimicrobial discs. The results of this experiment showed that the extracts produced with *P. roqueforti* did not demonstrate antimicrobial activity in the strains tested, whereas those produced with *P. camemberti* on the coconut oats substrate and on the wheat substrate with Pará nuts inhibited 30% and 40% of the strains, respectively. The most effective antibiotics fronts the strains was *Meropenem* with halo of 27.2. Penicillin had a lower halo, 3 mm.



Venancio Ferreira de Moraes Neto¹, Marilene da Silva Lima¹, Ana Paula Rodrigues Nunes¹, Renato Henrique Florêncio Teixeira¹, Rodrigo Henrique Fidelix Silva¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns.
E-mail: venanciomoraes@hotmail.com

Contato principal

Venancio Ferreira de Moraes Neto ¹



Palavras chave: Mastite; Atividade antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*

Keywords: Mastitis; Antimicrobial Activity; *Staphylococcus aureus*.



INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença caracterizada por inflamação da glândula mamária quando micro-organismos se deparam com condições para desenvolvimento, geralmente de modo infeccioso, podendo ser originada por bactérias ou outros micro-organismos como algas e fungos (Moreira et al. 2014).

Há uma redução da qualidade do leite e derivados quando o animal é portador de mastite bovina, pois a presença de agentes patogênicos é eminente, visto que esse leite apresenta alto potencial de contaminação por conter um grande número de micro-organismos. A perda da qualidade dos lácteos é devida a modificações organolépticas e físico-químicas que ocasionam prejuízos ao produtor e aos laticínios, gerando mais gastos (DEMEU et al., 2016; LOPES et al. 2017)

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva, responsável por muitas doenças em animais e humanos, sendo principalmente envolvida em casos de mastite. Esse micro-organismo produz várias toxinas extracelulares e fatores de virulência que estão relacionados à sua patogenicidade. Estudos acerca da suscetibilidade dos micro-organismos, isolados da mastite, apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, assim percebe-se que é necessário o conhecimento de padrões de resistência desses micro-organismos para o desenvolvimento de métodos efetivos para o controle de contaminação em alimentos e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário (AHMAD et al. 2015; ZANETT et al. 2010).

Desde a descoberta das bactérias, em 1670, por Leeuwenhoek, o homem tem tentado desenvolver fármacos sintéticos para destruir ou mitigar a ação desses micro-organismos. O marco da descoberta ocorreu com a produção da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, demonstrando que os fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana e assim impulsionando as pesquisas na busca de antibióticos (GUIMARÃES, 2010).

Segundo Freire (2014), existem 50.000 metabólitos secundários de micro-organismos, sendo que, 12.000 são antibióticos conhecidos. Destes 55% foram produzidos por actinomicetos e 22% por fungos filamentosos. Esses são organismos com metabolismo ativo e explorados industrialmente para produção de enzimas, vitaminas, polióis, pigmentos e vários outros metabólitos.

Os fungos filamentosos são também fontes de metabólitos antimicrobianos, antifúngicos e antivirais. Segundo Rêgo Júnior et al. (2011), os produtos fármacos naturais, apresentam inúmeras vantagens como diversidade química, por exemplo, além do que, sua complexidade estrutural e atividade biológica, são recursos pouco explorados. Devido ao aumento da resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos já descobertos, ultimamente, pesquisas têm focado na descoberta de novos e eficientes agentes antibacterianos. Assim, esse trabalho teve como objetivo testar a ação antimicrobiana de extratos

produzidos a partir de fungos filamentosos em fermentação em estado sólido, sobre estirpes de *S. aureus* isoladas de bovinos com mastite.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ensino de Biologia Animal - LEBA na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE-UAG). Foram produzidos extratos a partir de fungos filamentosos para posteriores testes da ação antimicrobiana dos extratos aquosos.

Fungos utilizados para obtenção dos extratos

Nesse experimento foram utilizados os seguintes fungos: *Penicillium roqueforti* 40074, cedido pela Fiocruz (RJ) e *Penicillium camemberti*. Este último foi isolado do fermento lácteo comercial (Christian Hansen).

Produção do extrato metabólico, através da fermentação em estado sólido

Os micro-organismos utilizados, nesse experimento, foram cultivados em meio BDA por 5 dias a 30°C. Em seguida foi preparado o inóculo, utilizando água estéril e ajustado até a concentração de esporos de 10⁶ UFC/mL, na câmara de *Neubauer*.

Um meio mineral nutritivo foi elaborado a fim de umedecer o material para a fermentação em estado sólido, contendo a seguinte composição (mg/L): Carbonato de Cálcio (0,6); (NH₄)₂SO₄ (0,7); KH₂PO₄ (0,65). O pH do meio líquido foi ajustado para 4,8 com HCL a 1 N.

Foram elaborados extratos a partir da fermentação em estado sólido com dois meios diferentes utilizando dois fungos diferentes (*P. camemberti* e *P. roqueforti* 40074) a saber: o primeiro foi composto por aveia em flocos desidratada (80%), adicionado de coco em pó desidratado (20%) para o *P. camemberti* e *P. roqueforti* (PCAC e PRAC, respectivamente); O segundo meio elaborado, foi composto por farelo de trigo (80%) adicionado de castanha do Pará triturada (20%), também para o *P. camemberti* e *P. roqueforti* (PCTC e PRTC, respectivamente). Os substratos foram adquiridos em supermercado local (EL-NAGGAR, 2009).

Em seguida, o material, recebeu uma alíquota de 7 mL do meio mineral nutritivo e foram autoclavados a 121°C por 15 minutos em *Erlenmeyers* com capacidade de 500 mL.

O inóculo, de cada fungo, separadamente, foi semeado nos dois diferentes meios sólidos. Em seguida, os *Erlenmeyers* foram colocados a temperatura ambiente (28°C) por 10 dias. Todos os dias os meios eram agitados manualmente, por 3 minutos, para aeração. Após o cultivo, cada meio foi lavado adicionando-se 7,5 mL de água destilada estéril para cada grama da amostra. Esse material permaneceu numa mesa agitadora a 150 rpm por 1 hora. Em seguida foi filtrado em papel de filtro estéril, centrifugado a 20000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -18°C até o momento das análises.

Bactérias e preparo do inóculo

Para avaliar a acção dos extratos produzidos, foram utilizadas estirpes de *S. aureus* (111, 115, 160, 321, 326, 335, 342, 347) cedidas pelo laboratório de microbiologia do CENLAG-UFRPE. Como controle positivo, foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923. Os micro-organismos foram mantidos sob congelamento a -18°C. A reativação dos mesmos ocorreu 48 horas antes do experimento, utilizando caldo BHI.

Para preparo do inóculo, todas as cepas testadas nesse experimento, foram previamente repicadas em caldo BHI e incubadas a 37°C/24 horas. A suspensão bacteriana foi preparada conforme escala *McFarland* 0,5(10⁸ UFC/mL) em espectrofotômetro (580 nm), para cada estirpe.

Teste de sensibilidade

O teste da atividade antimicrobiana foi realizado pela técnica de difusão em disco. Para tanto, discos de papel de filtro (6mm) foram preparados e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Foram preparadas placas com ágar *Mueller Hinton* para realização dos testes. Cada estirpe foi semeada individualmente nas placas, através da técnica de esgotamento, utilizando *swabs*, a partir do inóculo das mesmas. Em seguida as placas receberam os discos de papel de filtro e cada um, uma alíquota de 10µL do fermentado. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação de halo de inibição medido em milímetros. As cepas que apresentaram sensibilidade aos

extratos brutos foram submetidas a um novo teste utilizando discos de fármacos antimicrobianos: Gentamicina – GEN (10µg); Tetraciclina – TET (30µg); Oxacilina -OXA (1µg); Cefepime (30µg); Penicilina-PEN(10UI) ; Ciprofloxacina -CIP (5µg); Cefalantina – CEF(30µg). As análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antimicrobiana, dos extratos aquosos, podem ser vistos na Tabela 1. De modo geral, os extratos apresentaram pouca atividade antimicrobiana frente as estirpes testadas. Conforme os dados, verificou-se que 100% das estirpes foram resistentes a acção dos extratos produzidos com o *P. roqueforti* 40074 nos diferentes meios sólidos (PRAC e PRTC).

A atividade antimicrobiana foi observada quando se utilizou os extratos PCTC e PCAC. Este produziu o halo inibitório nas estirpes 111, 335 e 347 (30%) com de 27mm, 14mm e 19mm, respectivamente, porém não inibiu o micro-organismo controle (*S. aureus* 25923). O extrato do meio PCTC também demonstrou atividade antimicrobiana em 40% das bactérias testadas.

Em um estudo, Laich (2002), utilizou vinte e três espécies de *Penicillium sp.*, em fermentações em estado sólido e líquida para verificar a produção de penicilina pelas espécies. Este observou que as espécies *P. roqueforti* e *P. camemberti*, não produziram nenhuma atividade antibiótica sob as condições testadas. Diferentemente, nesse experimento, o *P. camemberti*, mostrou atividade nos dois diferentes meios sólidos utilizados.

Tabela1. Atividade antimicrobiana (mm) dos extratos produzidos pelos fungos *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* 40074 sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

Código das estirpes	Extratos produzidos na fermentação em estado sólido			
	PCAC	PRAC	PCTC	PRTC
25923	R	R	R	R
111	27	R	R	R
115	R	R	19	R
117	R	R	14	R
160	R	R	R	R
321	R	R	R	R
326	R	R	15	R
335	14	R	R	R
342	R	R	R	R
347	19	R	14	R

R- estirpe resistente ao antimicrobiano; **PCAC** –*P. camemberti* em substrato de farelo de aveia + coco ralado desidratado; **PRAC**-*P.*

roqueforti em substrato de farelo de aveia + coco ralado desidratado; **PCTC** - *P. camemberti* em substrato de farelo de trigo + castanha do Pará triturada; **PRTC**- *P. roqueforti* em substrato de farelo de trigo + castanha do Pará, triturada.

Outro estudo, realizado por Rapela (2005) o gênero *Penicillium*, cultivado em meio sólido, demonstrou atividade antimicrobiana quando testado contra o *S. aureus*. Isso sugere haver diferenças no mecanismo microbiano de cada espécie, bem como a influência da composição dos substratos nos meios utilizados para a fermentação.

O teste dos antibióticos comerciais frente as estirpes mais sensíveis aos extratos dos *P. roqueforti* 40074 e *P. camemberti*, podem ser vistos na Figura 1. Observa-se que o fármaco Meropenem inibiu todas as estirpes com o mesmo padrão de ação. Já os demais tiveram a ação antibiótica maior ou menor conforme a estirpe.

A estirpe Sa111 foi altamente sensível a cefalotina (CFL) enquanto o micro-organismo controle (Sa25923) foi altamente sensível a ampicilina (AMP). Entretanto, esta,

apresentou resistência aos antibióticos OXA, TET e CP. Essa resistência do *S. aureus*, particularmente a OXA, também foi observada por Saraiva (2012), no seu estudo de perfil de suscetibilidade de isolados selvagens de *S. aureus*, porém a cepa demonstrou sensibilidade à vancomicina, e ciprofloxacina.

Nesse experimento, a penicilina (PEN) demonstrou menor efeito inibitório, com médias que variaram de 3 a 7 mm de halo nas estirpes testadas (Figura 1). No estudo de Freitas et al. (2005), sobre o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positiva, afirmam que esse gênero é resistente a penicilina, a ampicilina, amoxicilina e carbenicilina quando se trata de micro-organismos isolados do leite, de animal com mastite, e os mesmos, consideram que nem sempre tratamento *in vivo* apresenta a mesma eficácia que *in vitro*.

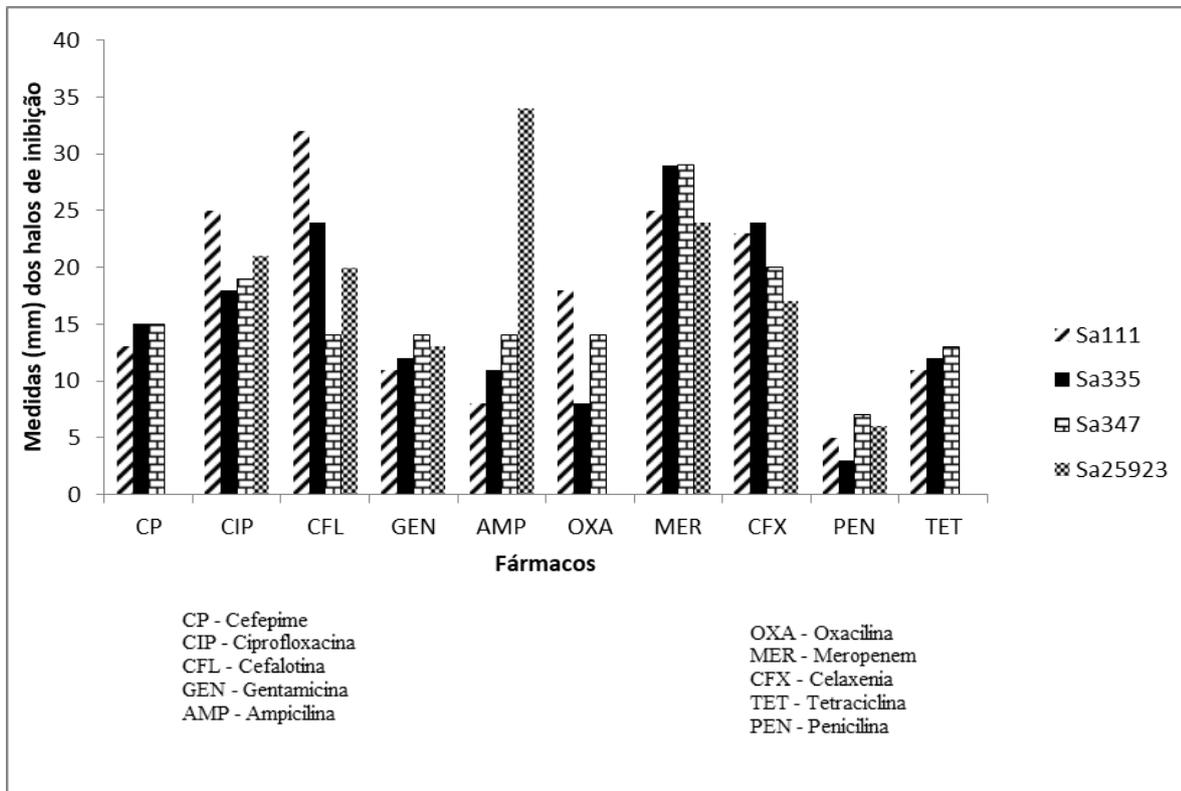


Figura 1. Atividade de antibióticos sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados, do trabalho, foi observado que os extratos aquosos PRAC e PRTC não inibiram o crescimento das estirpes de *S. aureus*. Entretanto os extratos do PCAC e PCTC demonstraram atividade inibitória em 30% e 40% respectivamente. Assim, são necessários mais estudos com o gênero *P. camemberti*,

visto que o mesmo demonstrou potencial na produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, como também, mais testes com diferentes substratos. Dentre os antibióticos, as estirpes demonstraram maior sensibilidade ao Meropenem. A penicilina demonstrou atuar fracamente na inibição das estirpes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; HAO, H.; HUANG, L.; SANDERS, P.; WANG, X.; CHEN, D.; Integration of PK/PD for dose optimization of Cefquinome against *Staphylococcus aureus* causing septicemia in cattle. **Front. Microbiology**, v. 15, 2015
- DEMEU, F.A.; LOPES, M.A.; COSTA, G.M.; ROCHA, M.C.M.B.; SANTOS, G. Efeito da produtividade diária de leite no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, p. 53-71, 2016.
- EL-NAGGAR, M.Y.; EL-ASSAR, S. A.; ABDUL-GAWAD, S.M. Solid-State Fermentation For The Production of Meroparamycin by *Streptomyce sp.* Strain MAR01. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 468-473, 2009. Disponível em: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2009&vol=19&num=5&page=468>. Acesso em 06/07/2017.
- FREIRE, F.C.O.; VASCONCELOS, F.R.; COUTINHO, I.B.L. Fungos endofíticos: Uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.
- FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A.; Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- LAICH, F.; FIERRO, F.; MARTIN, J.F. Production of Penicillin by Fungi Growing on Food Products: Identification of a Complete Penicillin Gene Cluster in *Penicillium griseofulvum* and a Truncated Cluster in *Penicillium verrucosum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1211-1219, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123731/>. Acesso em 03/09/2017.
- LOPES, M.A.; DEMEU, F.A.; COSTA, G.M.; ROCHA, M.C.M.B.; BRUHN, F.R.P. Representatividade de diferentes fatores no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, v. 74, n. 2, p. 135-147, 2017.
- MOREIRA, G.M.B.; MATSUMOTO, L.S.; SILVA, R.M.G.; DOMINGUES, P.F.; MELLO-PEIXOTO, E.C.T. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum Linn.* sobre *Staphylococcus spp.* isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 7, p. 626-632, 2014.
- SARAIVA, R.M.C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 2012, 94f, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2012.
- RAPELA, M.G.L.; GONZÁLEZ, A.M; LURÁ, M.C.; Determinación de la actividad antibacteriana de hongos del género *Penicillium* presentes en embutidos secos. **FACIB**, v. 9 p. 175-180, 2005.
- RÊGO JUNIOR, N.O.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.D.; SILVA, L.C.; GUALBERTO, A.S.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. Compostos bioativos e atividades antioxidantes de extratos bruto de espécies vegetais da caatinga. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2011.
- ZANETT, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010. Disponível em: <https://editora.unoesc.edu.br/index.php/acbs/article/viewFile/45/pdf>. Data de acesso: 03/09/2017.