

Atividade inibitória de bactérias patogênicas sobre fungos isolados da pele humana.

Fabricio Henrique de Souza¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carolina Parcerro¹ (IC), Diany Reis¹ (PG), Carla Porto² (PQ), Eduardo Jorge Pilau¹ (Orientador), e-mail: ejpilau@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Química/ Maringá, PR.

²Unicesumar / Mestrado em Ciência, Tecnologia e Segurança Alimentar e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação (ICETI) / Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra – Química/ Química Analítica

Palavras-chave: co-cultura, fungos, microrganismos.

Resumo:

A pele é um ecossistema complexo e dinâmico que é habitado por bactérias, *archaea*, fungos e vírus. Esses microrganismos que constituem a microbiota da pele são fundamentais para fisiologia e imunidade da pele. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, provenientes de diversas fontes, a fim de combater um fenômeno emergente, a resistência microbiana aos antibióticos. Buscando desvendar o papel das comunidades microbianas na saúde humana e no meio ambiente, tal abordagem permitirá aprimorar a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos que representam um grande desafio no tratamento de várias doenças e infecções. Dessa forma, neste projeto propõe-se investigar e avaliar métodos de prospecção de novos agentes antimicrobianos em novas fontes biológicas, como os microrganismos.

Introdução

Microrganismos (MOs) representam uma das principais fontes de biomassa do mundo, apresentando alta diversidade genética e química ainda pouco explorada (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998). As comunidades microbianas podem existir no meio ambiente e em hospedeiros como comensalistas, mutualistas e parasitas, podendo afetar a agricultura, o ambiente e a saúde humana (RATH e DORRESTEIN, 2012). O co-cultivo microbiano é uma estratégia poderosa que tem se destacado na busca por novos metabólitos bioativos, pois desafia um determinado microrganismo a um estresse biótico que pode ser induzido através da interação produzida artificialmente por cultura de dois ou mais MOs juntos (DE ROY et al, 2014). A co-cultura envolve o cultivo de dois ou mais MOs em meios de cultura sólidos ou "fermentação mista" quando em meios líquidos. Essa abordagem é inspirada nas comunidades de microbianas naturais que são de natureza onipresente. Nessas comunidades, os MOs interagem através da sinalização

química, produzindo metabólitos relacionados com o tipo de interação envolvida (sexualização, inibição do crescimento ou estimulação), principalmente no contexto da defesa e concorrência por nutrientes (BERTRAND et al, 2014). Esses metabólitos biologicamente ativos ultimamente têm ganhando destaque, devido ao crescente interesse em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de microrganismos, a fim de combater o aumento dramático da resistência aos antimicrobianos (ELLEUCH, et al, 2010).

Materiais e métodos

Microorganismos selecionados

Neste trabalho foram utilizadas as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e fungos de origem cutânea como o *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Aureobasidium* sp. e *Cytospora* sp.

Cultivo de microrganismos

Para o crescimento dos fungos filamentosos foram utilizados o meio de cultura de ágar extrato de malte e levedura (ISP2, do inglês *yeast extract-malt extract agar*), com temperatura de incubação de 28°C por 7 dias. As bactérias foram cultivadas em placas de ágar contendo meio LB (Luria-Bertani), *overnight*, à 37°C. As cepas isoladas das bactérias foram suspensas em tubo de ensaio contendo solução salina e padronizada de acordo com a escala de Mc Farland.

Ensaio de interação microbiana através de co-cultura

Para interação fungo – bactéria, os MOs foram inoculados a uma distância de 1,5 cm entre si, adicionando uma ponta de espátula do fungo e 10 µL de inóculo de bactéria, previamente preparada, com o auxílio de uma alça de inoculação criando uma barreira.

Extração dos metabólitos dos fungos e das co-culturas

Tanto os fungos cultivados isoladamente (mono-culturas) quanto as co-culturas foram submetidas a processos de extração na qual três fragmentos de 5 mm foram cortados da região de interação e transferido para um tubo de 2 mL com 1 mL de metanol (MeOH). Esta mistura foi sonicada durante 15 minutos, agitada por 10 minutos, centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante coletado para análise por UHPLC-MS/MS

Resultados e Discussão

Na primeira etapa do trabalho foram realizados ensaios de mono e co- cultivo, dos fungos selecionados. Essas análises consistiram no monitoramento constante de alterações das colônias, como mudança de cor, formato, formação de halo em interações competitivas. A co-cultura do fungo comensal *Phoma* sp. (F40) com as

bactérias *P. aeruginosa* (PA) e *S. Aureus* (SA), foram monitoradas por 7 dias para avaliar interações entre as espécies. A figura 1 mostra o ensaio de co-cultivo do F40-SA em 3 dias (A), na qual foi observado uma interação significativa com inibição no crescimento da SA. Em 7 dias (B), somente a região inibida foi ocupada pelo fungo, sugerindo que possa ter liberação de substâncias com atividade antibactericida, o que permitiu seu crescimento nessa região.

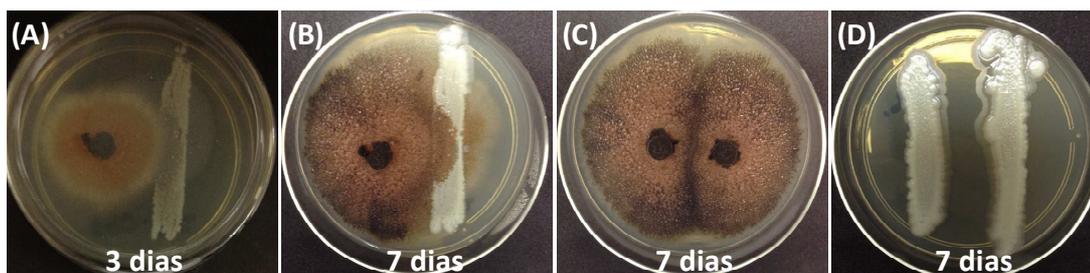


Figura 1 – Monitoramento da co-cultura fungo-bactéria com 3 (A) e 7 dias (B) e as culturas isoladas, (C) *Phoma sp.*(F40) e (D), a bactéria *S aureus* (SA).

Após 7 dias de incubação foi possível observação visual da interação fungo-bactéria. Assim, o perfil metabólico da região de interação foi analisado por UHPLC-MS/MS. A figura 2 traz algumas moléculas identificadas, como o composto **1**, um derivado piridínico da classe das lactamas relatado por participar do metabolismo microbiano na biossíntese de antibióticos. A lactama identificada participa da biossíntese do ácido clavulânico. Esse ácido é um fármaco que age inibindo a ação das beta-lactamases, enzimas responsáveis pela perda de ação de algumas classes de antibióticos e pode participar da biossíntese de vários antibióticos importantes. Além disso, tal metabólito também participa da rota metabólica sinalizadora de infecção por *Staphylococcus aureus*.

O composto **2**, identificado como um derivado benzodioxole é um heterobicclico contendo anéis de furano e pirano orto-fundidos conhecido por participar de rotas metabólicas relacionadas ao metabolismo e biossíntese de ácidos graxos, biossíntese de hormônios esteroidais bem como na degradação de diversos compostos aromáticos. Ambos compostos também participam de rota de sistemas de transdução de sinal de dois componentes, através de mecanismos de *quorum sensing*. Esses sistemas permitem que as bactérias percebam, respondam e se adaptem às mudanças em seu ambiente ou em seu estado intracelular e permitem que as células sintam e respondam a estímulos, induzindo mudanças na transcrição.

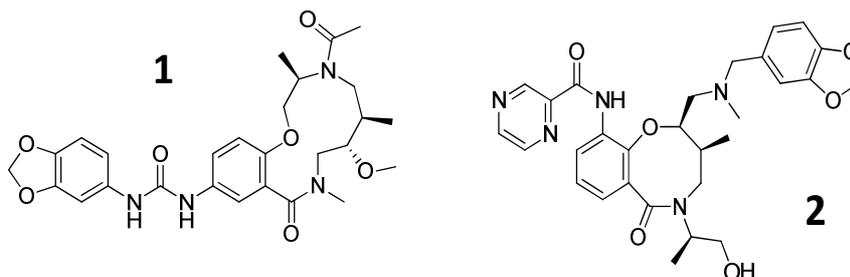


Figura 2– Estrutura química dos metabólitos pertencente à classe das lactamas (**1**) e (**2**) uma benzodioxoles extraídos exclusivamente na co-cultura do *Phoma sp.* com a *S. aureus*, F40-SA.

Conclusões

O estudo de comunidades de fungos isolados e em comunidades através da triagem de co-cultivo foi importante para estudar as comunidades, detectar padrões morfológicos de crescimento de fungos e bactérias bem como os tipos de interações mais comuns como o crescimento excessivo, inibição por contato, linhas de zona e inibição de distância proveniente da interação entre os pares de microrganismos. Além disso, foi possível identificar metabólitos provenientes da interação fungo-bactéria como um composto pertencente à classe das lactamas e uma benzodioxoles. Dessa forma, o estudo aprofundado desses compostos possui extrema relevância, pois facilita o entendimento das rotas metabólicas, aumentando o conhecimento sobre os MOs como fungos e bactérias, bem como os papéis que desempenham em sistemas biológicos como na pele e em determinadas doenças.

Agradecimentos

UEM/DQI, PIBIC/CNPq/FA/UEM e à organização do evento.

Referências

- BERTRAND, Samuel et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- DE ROY, Karen et al. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1472-1481, 2014.
- ELLEUCH, Lobna et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 579-593, 2010.
- RATH, Christopher M.; DORRESTEIN, Pieter C. The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2012.
- WHITMAN, William B.; COLEMAN, David C.; WIEBE, William J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.