

Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

# Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 3



Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

# Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 3



2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Luiza Batista

**Edição de Arte:** Luiza Batista

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Luis Ricardo Fernando da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof<sup>a</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof<sup>a</sup> Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Prof<sup>a</sup> Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof<sup>a</sup> Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Prof<sup>a</sup> Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof<sup>a</sup> Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR  
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
 Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
 Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
 Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
 Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
 Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
 Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
 Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
 Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
P474	<p>Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia 3 [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF            Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader            Modo de acesso: World Wide Web            Inclui bibliografia            ISBN 978-65-5706-143-5            DOI 10.22533/at.ed.435200107</p> <p>1. Microbiologia – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.</p> <p style="text-align: right;">CDD 579</p>
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

Temos o prazer de dar continuidade ao tema de microbiologia inter-relacionado à pesquisa científica e tecnológica iniciado pela editora no ano de 2019. Apresentamos aqui um novo volume deste contexto, denominado “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia, volume 3” contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos do território nacional contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

A microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. Como uma ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria.

A microbiologia como ciência iniciou a cerca de 200 anos, entretanto os avanços na área molecular como a descoberta do DNA elevou a um novo nível os estudos desses seres microscópicos, além de abrir novas frentes de pesquisa e estudo. Sabemos na atualidade que os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e a falta de conhecimento que havia antes da invenção do microscópio hoje não é mais um problema no estudo, principalmente das enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

Temas ligados à pesquisa e tecnologia microbiana são, deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Portanto a obra propõe uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos em alguns campos da microbiologia, abrindo perspectivas futuras para os demais pesquisadores de outras subáreas da microbiologia.

Assim, desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DA CASCA DOS FRUTOS DE <i>Hymenaea courbaril</i> L SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Diogo Siebra Alencar Gleilton Weyne Passos Sales Suelen Carneiro de Medeiros Mary Anne Medeiros Bandeira Nádia Accioly Pinto Nogueira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4352001071</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>12</b>
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS E CASCA DE <i>Jacaratia spinosa</i> (Aubli) A. DC. (MAMOEIRO-BRAVO)	
Katiele Pelegrini João Augusto Firmino de Carvalho Jakson José Ferreira Graciele Fernanda de Souza Pinto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4352001072</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>18</b>
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA MACRÓFITA <i>Hydrocotyle bonariensis</i> Lam (APIACEAE)	
Andreza Larissa do Nascimento Joyce Bezerra Guedes Antônia Ângela Bezerra José Fabricio de Carvalho Leal Maria do Socorro Meireles de Deus Ana Paula Peron Márcia Maria Mendes Marques Duque Ana Carolina Landim Pacheco	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4352001073</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>35</b>
O ESTADO DA ARTE DO COMPLEXO <i>Cryptococcus neoformans</i> E DA CRIPTOCOCOSE	
Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira Lúcia Kioko Hasimoto e Souza Benedito Rodrigues da Silva Neto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4352001074</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>57</b>
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PROTEIN EXTRACT INDUCES IP10 PRODUCTION IN BLOOD SAMPLES OF INDIVIDUALS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS	
Rogério Reis Conceição Samanta Queiroz dos Santos Zunara Victória Santana Batista Ramon Mendes dos Santos Silvânia Maria Andrade Cerqueira Caio Lopes Borges Andrade Soraya Castro Trindade Fúlvia Soares Campos de Sousa Lília Ferreira de Moura-Costa Marcos Borges Ribeiro	



Roberto Meyer  
Songelí Menezes Freire  
DOI 10.22533/at.ed.4352001075

**CAPÍTULO 6 ..... 66**

EFFECTS OF SUB-INHIBITORY CONCENTRATION OF ANTIMICROBIALS IN *Bacteroides fragilis* STRAINS ISOLATED FROM INTRA-ABDOMINAL INFECTIONS

Marcela Abreu Menezes  
Priscila Simão Costa  
João Paulo Amaral Haddad  
Cristina Dutra Vieira  
Luiz de Macêdo Farias  
Simone Gonçalves dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.4352001076

**CAPÍTULO 7 ..... 83**

EFICÁCIA DE ÁLCOOL GEL COMO ANTIMICROBIANO DE SUPERFÍCIES INERTES

Cristiane Coimbra de Paula  
Fabrício Caram Vieira  
João Pedro Castoldo Passos  
Caroline Aquino Vieira de Lamare  
Walkiria Shimoya-Bittencourt

DOI 10.22533/at.ed.4352001077

**CAPÍTULO 8 ..... 91**

EVALUACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE NOVILLOS ALIMENTADOS CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Maria Juliana Moncada Diaz  
Luciano Antônio Ritt  
Michele Bertoni Mann  
Ana Paula Guedes Frazzon  
Jeverson Frazzon  
Vivian Fischer

DOI 10.22533/at.ed.4352001078

**CAPÍTULO 9 ..... 100**

OBTENÇÃO DE CELULASES MICROBIANAS: UMA BREVE REVISÃO

Tatielle Pereira Silva  
Alexsandra Nascimento Ferreira  
Cledson Barros de Souza  
Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos  
Marta Maria Oliveira dos Santos  
Hugo Juarez Vieira Pereira

DOI 10.22533/at.ed.4352001079

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 111**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 112**

## ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DA CASCA DOS FRUTOS DE *Hymenaea courbaril* L SOBRE *Staphylococcus aureus*

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 15/03/2020

### **Diogo Siebra Alencar**

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Fortaleza – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3648500105483524>

### **Gleilton Weyne Passos Sales**

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Fortaleza – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/7835870865998265>

### **Suelen Carneiro de Medeiros**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnológica do Ceará  
Morada Nova - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/9010177694544049>

### **Mary Anne Medeiros Bandeira**

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Farmácia  
Fortaleza – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/6291887019034026>

### **Nádia Accioly Pinto Nogueira**

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Fortaleza – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/9261322165669741>

**RESUMO:** O estudo da atividade antimicrobiana de *Hymenaea courbaril* L., popularmente conhecida como “jatobá”, foi realizado com as cascas dos frutos desta espécie, a qual tem várias aplicações na medicina popular. Dentre elas, no combate a afecções pulmonares de modo geral, dores, cólicas estomacais, como vermífugo e anti-diarreico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico fluido e seco obtidos a partir da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L., *in vitro*, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, e relacionar essa atividade biológica com a sua composição química. Das cascas dos frutos maduros, foram extraídos extratos brutos hidroalcoólicos, sendo um fluido e o outro seco. A análise fitoquímica dos extratos demonstrou a presença de flavonóides, taninos catéquicos, alcalóides, heterosídes digitálicos e triterpenóides. O potencial antimicrobiano dos extratos foi determinado pelos métodos de microdiluição em caldo e pela técnica de contagem por microgota. Os resultados obtidos indicam que os extratos testados são bons agentes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivo, especificamente contra cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a oxacilina. As mais baixas CIM e CLM obtidas para os extratos fluido e seco foram de 0,625mg/

mL e 1,25mg/mL e 0,625mg/mL e 2,5mg/mL, respectivamente. Conclui-se que os extratos obtidos da casca dos frutos maduros de *H. courbaril L.* apresentam pequeno espectro de ação antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados, porém, novos estudos químicos, farmacológicos e clínicos devem ser realizados a fim de identificar substâncias ativas, em sua composição, com potencial antimicrobiano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Jatobá, Antimicrobiano, Plantas medicinais, *Staphylococcus aureus*.

## PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM THE FRUIT PEEL OF *Hymenaea courbaril L* AGAINST *Staphylococcus aureus*

**ABSTRACT:** The study of the antimicrobial activity of *Hymenaea courbaril L.*, popularly known as “jatobá”, was carried out with the fruit peels of this species, which has several applications in folk medicine. Among them, in the fight against lung diseases in general, pain, stomach cramps, such as vermifuge and anti-diarrheal. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of the crude fluid and dry hydroalcoholic extract obtained from the peel of the fruits of *Hymenaea courbaril L.*, in vitro, against strains of *Staphylococcus aureus*, and to relate this biological activity with its chemical composition. From the peels of the ripe fruits, crude hydroalcoholic extracts were extracted, one fluid and the other dry. The phytochemical analysis of the extracts demonstrated the presence of flavonoids, catechic tannins, alkaloids, digitalis heterosides and triterpenoids. The antimicrobial potential of the extracts was determined by the broth microdilution methods and by the microtip counting technique. The results obtained indicate that the tested extracts are good antimicrobial agents against Gram-positive bacteria, specifically against oxacillin-sensitive and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. The lowest MIC and CLM obtained for the fluid and dry extracts were 0.625mg / mL and 1.25mg / mL and 0.625mg / mL and 2.5mg / mL, respectively. It is concluded that the extracts obtained from the peel of ripe fruits of *H. courbaril L.* have a small spectrum of antimicrobial action against the microorganisms evaluated, however, new chemical, pharmacological and clinical studies must be carried out in order to identify active substances, in their composition, with antimicrobial potential.

**KEYWORDS:** Jatobá, Antimicrobial, Medicinal plants, *Staphylococcus aureus*.

## 1 | INTRODUÇÃO

Durante séculos, as plantas foram amplamente utilizadas para fins medicinais em várias culturas, e o interesse mundial por esses insumos aumentou principalmente nas últimas décadas, onde pesquisas utilizando plantas medicinais foram alvo de diversos estudos (STREET & PRINSLOO, 2013; EKOR, 2014).

No Brasil, sua vasta biodiversidade, seus conhecimentos tradicionais abundantes e sua cultura comum do uso de plantas medicinais, tudo isto refletiu em um grande interesse

para a realização de importantes pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de vegetais (DE SOUZA et al., 2017).

Com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos as pesquisas com plantas medicinais passaram a receber um maior destaque, garantindo assim o acesso seguro de plantas medicinais para fins terapêuticos, além de fortalecer o desenvolvimento tecnológico no país (BRASIL, 2006).

Assim, há uma crescente investigação do potencial terapêutico de extratos de plantas medicinais onde alguns dos seus compostos com propriedade antimicrobiana como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas e saponinas têm sido objetos de interesse para o tratamento de vários tipos de infecções humanas (VERDI et al., 2005).

Os vegetais do gênero *Hymenaea* têm sido citados em muitos estudos com excelente potencial terapêutico e dentre suas 17 espécies descritas na literatura, vários compostos bioativos foram encontrados, como as procianidinas, ácidos graxos, flavonoides, cumarinas, terpenoides e compostos fenólicos (SASAKI et al., 2009; OMAIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; FERNANDES et al., 2015; MONTEIRO et al., 2015).

A *Hymenaea courbaril* L. é utilizada popularmente como carminativa, sedativa e adstringente, sendo o chá da casca e a seiva do tronco recomendados para o tratamento de diversas doenças como diarreia, disenteria, cólicas intestinais, afecções pulmonares, cólicas estomacais e verminoses, podendo também ser utilizadas como antioxidante, diurético, hepatoprotetor, estimulante e energético (VIEIRA, 1991; LORENZI; MATOS, 2002).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico fluido e seco obtidos a partir da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril* L., *in vitro*, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, bem como investigar a relação dessa atividade biológica com a sua composição química.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Obtenção e diluição dos extratos de casca dos frutos de *H. courbaril* L.

As amostras dos frutos maduros de *H. courbaril* L. (jatobá) foram obtidos na Chapada da Ibiapaba, município de Ubajara (CE). A identificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Biologia Universidade Federal do Ceará, e a exsiccata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC) sob o número 53048.

O extrato hidroalcoólico fluido do Jatobá foi preparado a partir da casca de frutos maduros. Após coleta, as casca dos frutos foram secas em estufa de ar circulante a 45°C.

Após este período, o material passou por um processo de moagem em moinho de facas. O pó obtido foi então submetido ao processo de maceração com etanol a 70% durante 10 dias, após a filtragem obteve-se, assim um extrato a 10% (p/v). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em água destilada a partir de uma concentração inicial de 100mg/mL.

Já para a obtenção do extrato bruto, as cascas dos frutos do Jatobá receberam o mesmo tratamento anteriormente citado, e o pó resultante foi extraído através de maceração, utilizando etanol a 70% durante 10 dias. O material líquido resultante foi concentrado em estufa de secagem a 30°C. Uma alíquota do extrato bruto hidroalcoólico seco foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das diluições seriadas a partir de uma concentração inicial de 100 mg/mL.

Para o cálculo do rendimento médio do extrato bruto hidroalcoólico seco foram pesados 10 gramas das cascas moídas e secas de *H. courbaril L.* e adicionados 100 mL do solvente (etanol 70%). Após 10 dias, a solução foi filtrada e o resíduo foi levado a estufa para secagem a 30°C. O extrato seco foi pesado e calculado o rendimento.

## 2.2 Análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos da casca dos frutos de *H. courbaril L.*

Para a análise fitoquímica das amostras, foram utilizadas as técnicas descritas por Matos (1997), onde os extratos hidroalcoólicos da casca dos frutos de *H. courbaril L.* foram dissolvidos em 100 mL de solução hidrofílica (etanol com 30% de água). Separando-se em porções de 3-4 mL em tubos de ensaio e duas porções de 10 mL em dois béqueres deixados em banho-maria até *secura* e mantidos em dessecador até a ocasião de serem usados.

### 2.2.1 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Alguns centigramas de magnésio em fita foram adicionados ao tubo e 0,5mL de HCl concentrado e, ao fim da reação (fim da efervescência) possíveis mudanças na cor da mistura foram observadas e comparada com a coloração da mistura do tubo contendo a droga padrão. O aparecimento de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas livres ou seus heterosídeos (MATOS, 1997).

### 2.2.2 Teste para taninos

Em tubos de ensaio contendo 3mL do extrato foram adicionadas três gotas de cafeína 2% e cloreto férrico, respectivamente. A formação de precipitado com a adição de cafeína é indicativa da presença de tanino. Já para o cloreto férrico, a mudança de coloração, apresentando um precipitado escuro de cor azul indica a presença de taninos

pirogálicos. Se houver o aparecimento de uma coloração verde, indica a presença de taninos catéquicos (MATOS, 1997).

### *2.2.3 Teste para alcalóides*

Em cinco tubos de ensaio contendo o extrato obtido inicialmente foram adicionadas três gotas dos reagentes de Mayer, Bouchardat, Dragendorf, Bertrand e Hager. A formação de precipitados frente a adição desses reagentes é indicativa da presença de alcalóides (MATOS, 1997).

### *2.2.4 Teste para saponinas*

O resíduo insolúvel, separado na operação inicial, foi redissolvido em 5-10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. A solução foi agitada fortemente por 2-3 minutos e observou-se a formação de espuma. A presença de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (MATOS, 1997).

### *2.2.5 Teste para heterosides digitálicos*

Em um tubo de ensaio, 2 mL da solução de ácido 3,5 – dinitrobenzóico foram adicionados a 2 mL do extrato. Em seguida, adicionou-se lentamente 2 mL de KOH 2N. O aparecimento de uma coloração castanho avermelhada indica a presença de princípios cardioativos (MATOS, 1997).

### *2.2.6 Teste para antocianinas*

Acidificou-se um dos tubos contendo 2 mL do extrato até pH 3 e depois verificou-se a ocorrência de coloração vermelha como indicativo da presença de antocianinas (MATOS, 1997).

### *2.2.7 Teste de Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides)*

O resíduo seco de um dos béqueres foi extraído três vezes com 3 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão e cobriu-se com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidrido, para um tubo de ensaio seco. 1 mL de anidrido acético foi adicionado, agitado e acrescentado 3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Após agitação, aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicou da presença de esteróides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indicou a presença de triterpenóides (MATOS, 1997).

### 2.3 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos das cascas dos frutos de *H. courbaril* L.

Para os ensaios de atividade antibacteriana utilizando os extratos hidroalcoólicos foram utilizados para a determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo de cultura (Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2, CLSI, 2003), utilizando microplacas estéreis com 96 poços de fundo redondo.

Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Merck) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Transcorrido esse tempo, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em meio BHI estéril, de modo a se obter uma turbidez equivalente a do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para a realização desta etapa, foi utilizado um cartão de fundo branco com linhas contrastantes pretas ao fundo, auxiliando no ajuste da suspensão microbiana, à olho nu, para a turbidez da escala de McFarland.

A suspensão ajustada foi diluída 100 vezes, em meio BHI estéril, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL que também foi diluída 100 vezes para a obtenção de outra contendo  $10^4$  UFC/mL. Essa foi utilizada posteriormente na determinação do tamanho do inóculo microbiano. Da suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL, foram retirados 80  $\mu$ L e adicionados aos poços da placa.

Cada poço da placa, continha 80  $\mu$ L de caldo BHI, 40  $\mu$ L do extrato e 80 mL de suspensão de microrganismo. As amostras dos extratos foram avaliadas em diversas concentrações (100 a 0,048 mg/mL).

Em relação aos controles positivos (inibição do crescimento microbiano) foi utilizado o meio de cultura, o agente antimicrobiano e o inóculo do microrganismo. Já para o controle negativo (não inibição do crescimento microbiano) foi usado meio de cultura, o diluente de cada extrato (Água destilada estéril e DMSO 10%) e o inóculo do microrganismo.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi determinada por inspeção visual e medida de absorbância a 620nm em leitor de Elisa Bio-Tek.

A CIM foi considerada a menor concentração de extrato ou de antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, mediante inspeção a olho nú (ausência de turvação visível). As leituras de absorbância foram utilizadas para evitar erros determinados pela turvação dos extratos.

De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5  $\mu$ L obtidos a partir dos poços das placas de microdiluição usadas para a determinação da CIM, que não apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar *Plate-Count*. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C durante 24h e foram feitas as contagens das colônias crescidas na

superfície do ágar. A concentração do extrato que determinou um crescimento microbiano na superfície do ágar < 0,1% do inóculo adicionado, foi considerada a CLM, ou seja, a menor concentração do extrato capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas testadas.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir da casca dos frutos de *H. courbaril L.* detectou a presença das seguintes classes químicas: flavonóides, taninos catéquicos, alcalóides, heterosídeos digitálicos e triterpenóides (Tabela 1), para os dois extratos analisados, o fluido e o seco. A presença de tais classes químicas foi confirmada através dos produtos obtidos em cada reação. O rendimento bruto do extrato de casca de frutos de *H. courbaril L.* foi de 8,22% (m/v).

Do jatobá podem ser isolados taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécnicas, amido e açúcares (PANIZZA, 1997; PINTO et al., 2000). Segundo Vidyleison et al., 2015, o extrato etanólico proveniente das cascas do tronco tinha a presença de cumarinas, flavonoides, alcaloides, taninos e triterpenos, uma constituição bastante similar a encontrada na casca dos frutos analisadas. As folhas e a casca possuem compostos terpênicos e fenólicos que agem como antimicrobianos (LORENZI; MATOS, 2002; (VIDYLEISON et al., 2015). Essas duas classes químicas foram encontradas, no presente trabalho, nas amostras de extrato analisadas, sendo representadas pelos triterpenóides e pelos flavonóides, respectivamente. Dessa forma, pode-se atribuir que partes das propriedades antimicrobianas dos extratos hidroalcoólicos podem ser provenientes da presença dessas classes químicas.

<b>Classes Químicas</b>	<b>Extrato bruto hidroalcoólico fluido</b>	<b>Extrato bruto hidroalcoólico seco</b>
<b>Flavonóides</b>	+	+
<b>Taninos pirogálicos</b>	-	-
<b>Taninos catéquicos</b>	+	+
<b>Alcalóides</b>	+	+
<b>Saponinas</b>	-	-
<b>Heterosídeos digitálicos</b>	+	+
<b>Antocianinas</b>	-	-
<b>Esteróides</b>	-	-
<b>Triterpenóides</b>	+	+

(+) Presença; (-) Ausência

Tabela 1 - Abordagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos da casca dos frutos de *H. courbaril L.*

Os resultados da CIM e CLM dos extratos hidroalcoólicos da casca dos frutos de *H.*



*courbaril* L. estão expressos na Tabela 2. Os resultados da CIM foram detectados através de leituras de absorbância a 620nm em leitor de Elisa (Bio-Tek). A detecção visível (a “olho nu”) não foi possível devido à turvação natural apresentada pelos extratos.

Cepas Microbianas	Extratos hidroalcoólicos			
	CIM*(mg/mL)		CLM**(mg/mL)	
	Fluido	Seco	Fluido	Seco
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0,625	0,625	1,25	2,5
<i>S.aureus</i> ATCC 14458	2,5	2,5	2,5	ND
<i>S.aureus</i> ATCC 33591	2,5	5,0	5,0	ND
<i>S.aureus</i> CCBH 5330	1,25	0,625	2,5	5,0

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos extratos hidroalcoólicos da casca dos frutos de sobre cepas microbianas originárias da ATCC e da CCBH, determinada pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2003) e pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2008)

ND: Não Determinada; \*Menor concentração de extrato hidroalcoólico capaz de inibir completamente o crescimento microbiano determinado através de leituras ópticas por meio da mensuração das absorbâncias a 620nm em leitor de Elisa (Bio-Tek). \*\*Menor concentração de extrato hidroalcoólico que determinou uma redução do crescimento microbiano de > 99,9% de inoculo adicionado. Controles: Amicacina (1,2mg/mL a 0,58µg/ mL), Água destilada para o extrato fluido e DMSO 10% para o extrato bruto.

Os valores de CIM de extrato fluido e o extrato seco foram iguais para as cepas sensíveis a oxacilina, *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458, sendo de 0,625mg/mL e 2,5mg/mL, respectivamente. Para as cepas resistentes a oxacilina, a melhor atividade inibitória foi constatada para o extrato seco, com CIM de 0,625 mg/mL para *S. aureus* CCBH 5330.

As CLM variaram de 1X CIM para a cepa *S. aureus* ATCC 14458 (cepa OSSA) a 8X CIM para a cepa *S.aureus* CCBH 5330 (cepa ORSA). O extrato fluido foi capaz de inviabilizar o crescimento de todas as cepas em concentrações menores que as necessárias para o extrato seco.

A menor CLM, 1,25mg/mL, foi observada para o extrato fluido sobre a cepa *S.aureus* ATCC 6538P (OSSA). De acordo com a tabela 2, fica evidente que o extrato bruto hidroalcoólico fluido apresenta uma maior atividade bactericida quando comparado ao extrato seco que possuiu uma menor capacidade de inviabilizar o crescimento microbiano, visto que os valores da CLM para esse foram maiores.

De acordo com Martins *et al.* (2010), os resultados da técnica de microdiluição em caldo demonstraram que houve atividade antimicrobiana, com CIM de 0,350 mg/mL, para isolados clínicos e cepas-padrão (ATCC) de *S. aureus*. No presente estudo, encontramos valores de CIM, de extrato fluido e seco de *H. courbaril*, para cepas padrão de *S. aureus* testadas variando de 0,625 a 5 mg/mL.

Essa diferença de atividade antimicrobiana dos extratos é mencionada por Auricchio

e Bacchi (2003), que consideram notória a dificuldade encontrada quando se comparam resultados de estudos com plantas medicinais, onde variáveis que vão desde os aspectos climáticos, composição química, estágio de desenvolvimento do vegetal, momento e forma de coleta, parte da planta estudada, forma de preparar o material estudado, até os protocolos seguidos nos experimentos, exercem enorme influência na potência do material estudado.

Boniface, Baptista-Ferreira e Roland-Kaiser (2017) compilaram da literatura vários trabalhos que relacionam as atividades biológicas da espécie *Hymenaea courbaril*, a partir de extratos obtidos de várias partes desse vegetal, incluindo atividades antibacterianas contra cepas de *S. aureus*. Aleixo et al. (2013) relatam atividade antibacteriana do extrato bruto de *H. courbaril* frente a cepas de *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) quando em associação com o extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens*.

O trabalho de Fosch (2012) aponta o *S. aureus* como um importante patógeno humano, sendo causador de infecções hospitalares e comunitárias devido a sua distribuição cada vez mais ampla e frequente. Este microrganismo pode ser encontrado nos mais diversos ambientes como solo, água, alimentos, bem como em partes anatômicas de mamíferos, tais como pele, axila, narinas, de modo transitório em partes do sistema gastrointestinal, vagina e trato urinário (ARVOLA et al, 2006), sendo capaz de causar desde furúnculos até sepse. São capazes de produzir diversos fatores de virulência, tais como várias toxinas extracelulares e enzimas relacionadas a patogenicidade.

*S. aureus* é considerado um dos maiores problemas relacionados a infecções hospitalares, geralmente, causando graves infecções crônicas, que podem ser refratários a terapia antimicrobiana. Essas infecções são frequentemente associadas com síndromes leves, como foliculite e intoxicação alimentar, podendo também serem associadas com síndromes de alta mortalidade, tais como pneumonia, endocardite e síndrome do choque tóxico (PINTO et al., 2015).

Daí a grande importância da investigação do potencial antimicrobiano de espécies vegetais ainda não completamente estudadas, como é o caso da *H. courbaril* L. Esse estudo abre possibilidades para a pesquisa de novas moléculas potencialmente ativas capazes de atuar sobre esse patógeno de elevada relevância.

## 4 | CONCLUSÃO

Os extratos hidroalcoólicos de jatobá apresentam uma elevada atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positivo *S. aureus*. Dessa forma, a *H. courbaril* L surge como um vegetal promissor para a investigação e o isolamento de moléculas potencialmente ativas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por esse patógeno, um dos mais prevalentes nas infecções nosocomiais. Portanto, novos estudos com abordagem

química, farmacológica e clínica devem ser realizados para que o *H. courbaril* L. venha a ser um insumo para a obtenção de um novo fármaco.

## REFERÊNCIAS

- ALEIXO, Á. A. et al. Propriedades antibióticas dos extratos de *stryphnodendron adstringens* e *hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2esp, p. 85, 15 jul. 2013.
- ARVOLA, T. et al. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. **Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. 760-768, 2006.
- AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p.55-61, 2003.
- BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 62-69, 2013.
- BONIFACE, P. K.; BAPTISTA FERREIRA, S.; ROLAND KAISER, C. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 193–223, jul. 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde - **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília – DF, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility testes for Bacteria that Grow Aerobically**. 6<sup>o</sup> ed. Approved Standard: M7-A6. CLSI, 2003.
- DA COSTA, M. P. et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 245, 2014.
- EKOR, M., 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front Pharmacol**. 4, pp. 10.
- FERNANDES, H. P. et al. New glycosylated biscoumarins from *Hymenaea coubaril* L. seeds. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 413-416, 2015.
- FOSCH, Sonia et al. Portación nasal de *Staphylococcus aureus* en individuos de la comunidad: factores epidemiológicos. **Acta bioquím. clín. Latinoam**. vol.46, n.1, pp. 59-68, 2012.
- STREET, R.A, PRINSLOO, G., 2013. Commercially important medicinal plants of South Africa: A review. **J. Chem**. pp. 16.
- DE SOUZA, Cintya Neves et al. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bacterias isoladas de ovinos com mastite. **Unimontes Científica**, v. 19, n. 2, p. 51-61, 2017.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: Edições UFC. 1997.
- MONTEIRO, A.F., BATISTA, J.M.JR., MACHADO, M.A., SEVERINO, R.P., BLANCH, E.W., BOLZANI, V.S., VIEIRA, P.C., SEVERINO, V.G. Structure and Absolute Configuration of Diterpenoids from

*Hymenaea stigonocarpa*. **J. NAT. PROD.** 78, 2015, 1451-1455.

OMAIRA et al. Perfil lipídico de las gomas de semilla de *Leucaena leucocephala* e *Hymenaea courbaril*. **Ciencia**, v. 19, n. 4, 2011.

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de mato)**. 15 ed. São Paulo: IBRASA, 1997. 279p.

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A. & LAMEIRA, O. A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 2000. 208p.

PINTO, M. F. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.21,n.1,pp.32-39, 2015.

SASAKI, K. et al. High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1274- 1279, 2009.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C, PIZZOLATTI MG 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim Nova** 28: 85-94.

VIDYLEISON, N. C. et al. Synergistic activity from *Hymenaea courbaril* L. and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville against multidrug-resistant bacteria strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 26, p. 741–748, 10 jul. 2015.

VIEIRA, L.S. **Manual da medicina popular - A fitoterapia na Amazônia**. FCAP - Belém-PA, 1991.

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS E CASCA DE *Jacaratia spinosa* (AUBLI) A. DC. (MAMOIEIRO-BRAVO)

Data de aceite: 01/06/2020

### Katiele Pelegrini

Centro Universitário das Faculdades Integradas  
de Ourinhos - UNIFIO  
Ourinhos/SP

### João Augusto Firmino de Carvalho

Centro Universitário das Faculdades Integradas  
de Ourinhos - UNIFIO  
Ourinhos/SP

### Jakson José Ferreira

Centro Universitário das Faculdades Integradas  
de Ourinhos - UNIFIO  
Ourinhos/SP

### Graciele Fernanda de Souza Pinto

Centro Universitário das Faculdades Integradas  
de Ourinhos - UNIFIO  
Ourinhos/SP

**RESUMO:** O *Jacaratia spinosa*, é amplamente utilizado na medicina popular. Apesar da atividade farmacológica de *J. spinosa* ser conhecida, são raros na literatura estudos que envolvam à espécie. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano de extratos orgânicos de folhas e casca do caule de *J. spinosa*, bem como seu perfil fitoquímico. Os extratos acetônico, acetato de etila e metanólico de folhas e da casca do caule

foram analisados frente a *S. aureus* e *E. coli*, na concentração de 96 mg mL<sup>-1</sup>, acompanhados do controle positivo azitromicina. Ademais, os extratos foram submetidos a triagem fitoquímica qualitativa por reações químicas, resultando no desenvolvimento de cor ou precipitado característico de cada classe de componentes químicos. A triagem fitoquímica dos extratos foi positiva para alcaloides e saponinas. O extrato acetato de etila de folhas inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, enquanto o extrato acetônico de casca inibiu o crescimento de *E. coli*. O extrato metanólico não manifestou atividade antimicrobiana. Os extratos de folhas e casca de *J. spinosa* apresentam atividade microbiana contra cepas bacterianas Gram-positiva e Gram-negativa, sendo uma fonte natural promissora de novas substâncias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicidade; Fitoquímica; Extrato orgânico.

**ABSTRACT:** The *Jacaratia spinosa*, is widely used in folk medicine. Although the pharmacological activity of *J. spinosa* is known, studies involving the species are rare in the literature. Thus, the objective of the study was evaluate the antimicrobial potential of organic leaves and bark extracts of *J. spinosa*, as well as their phytochemical profile. The acetone,

ethyl acetate and methanolic extracts of leaves and stem bark were analyzed against *S. aureus* and *E. coli*, at a concentration of 96 mg mL<sup>-1</sup>, followed by positive control azithromycin. In addition, the extracts were subjected to qualitative phytochemical screening by chemical reactions, resulting in the development of color or precipitate characteristic of each class of chemical components. The phytochemical screening of the extracts was positive for alkaloids and saponins. Leaf ethyl acetate extract inhibited the growth of *S. aureus* and *E. coli*, while acetone bark extract inhibited the growth of *E. coli*. Methanolic extract showed no antimicrobial activity. *J. spinosa* leaf and bark extracts have microbial activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, being a promising natural source of new substances.

**KEYWORDS:** Toxicity; Phytochemistry; Organic extract.

## 1 | INTRODUÇÃO

Pertencente à família botânica Caricaceae, *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC., é uma espécie nativa do Brasil, que apresenta ampla distribuição geográfica pelo território brasileiro e ocorre em distintas formações florestais, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (AGUIAR *et al.* 2012).

Popularmente conhecido como mamoeiro-bravo, mamoeiro-do-mato e mamãozinho, *J. spinosa*, é utilizado na medicina popular como cataplasma para tratar feridas e úlceras (FENNER *et al.* 2006; BREITBACH *et al.* 2013), ou como remédio contra febre alta associada a doenças urinárias (MUÑOZ *et al.* 2000). Em ensaios *in vitro*, o extrato da casca interna de *Jacaratia* inibiu o desenvolvimento do plasmodium *P. vinckei* em 99% e as raízes frescas de uma espécie intimamente relacionada, *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze, foram relatadas para o tratamento de dores de estômago, abdominais e vômitos (MUÑOZ *et al.* 2000). Apesar da atividade farmacológica de *J. spinosa* ser conhecida desde longa data (OLIVEIRA, 1854), são raros na literatura estudos que envolvam a avaliação da atividade biológica e perfil químico dessa espécie. Assim, nós avaliamos o potencial antimicrobiano de extratos orgânicos (de acetona, acetato de etila e metanol) de folhas e casca do caule de *J. spinosa*. Nos também realizamos estudo preliminar para determinar a composição de metabolitos secundários presentes nas folhas e na casca do caule de *J. spinosa*.

## 2 | MATERIAIS E METÓDOS

### 2.1 Material Vegetal

Folhas frescas e casca do caule de *J. spinosa* foram coletadas em Santo Antônio da Platina (Estado do Paraná, Brasil; latitude 23° 17' 19.2" S, longitude 50° 03' 13.5" W). O material botânico foi identificado pela Dra. Ana Odete Santos Vieira, no Departamento

de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina, e uma espécie depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL), Paraná, sobre número de registro FUEL 56091. O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar forçado à 60°C por 24 horas e triturado em moinho de facas do Tipo Willye. O pó obtido foi pesado, armazenado em recipiente de polietileno e mantido a 4°C até utilização.

## 2.2 Preparação dos extratos

Para o extrato acetônico de folhas adicionou-se 20 g do material vegetal em 200 mL de acetona, obedecendo a proporção 1:10 (p/v), mantendo-se sob agitação mecânica por 12 horas, a 24°C. Posteriormente, a solução foi filtrada e o filtrado evaporado, resultando no extrato acetônico de folhas, com rendimento de 10,55%. O resíduo vegetal foi então extraído com acetato de etila, conforme descrito anteriormente, fornecendo o extrato acetato de etila de folhas, com rendimento de 7,72%. O resíduo vegetal resultante da extração com acetato de etila, foi extraído com metanol, resultando no extrato metanólico de folhas, com rendimento de 5,47%. Os extratos de casca de *J. spinosa* foram obtidos seguindo o procedimento descrito nos extratos de folhas, resultando no extrato acetônico de casca, com rendimento de 0,30%; extrato acetato de etila de casca, com rendimento de 0,52% e extrato metanólico de casca, com rendimento de 2,24%. Posteriormente, os extratos foram ressuspensos nos respectivos solventes na concentração de 96 mg mL<sup>-1</sup> para o teste de difusão em disco.

## 2.3 Triagem fitoquímica

Os extratos foram submetidos a triagem fitoquímica para detectar as principais classes de metabólitos secundários (MATOS, 1997). Desta forma, usou-se: A) reativos de Mayer e Dragendorff para identificação de alcaloides; B) hidróxido de sódio para detecção de antraquinonas; C) água destilada para saponinas; D) hidróxido de potássio para detecção de cumarinas; E) ácido sulfúrico e anidrido acético para esteroides e triterpenoides; e F) cloreto de alumínio para identificar flavonoides.

## 2.4 Atividade antimicrobiana dos extratos

### 2.4.1 Preparação do inóculo

Foram utilizadas as cepas microbianas de *Staphylococcus aureus* (coco Gram-positivo) e *Escherichia coli* (bacilo Gram-negativo). As amostras bacterianas foram suspensas em caldo de enriquecimento BHI e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota das culturas foi semeada através da técnica de esgotamento por estrias em ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C por 24 h, viabilizando o crescimento exponencial dos microrganismos. Após esse período, foram ressuspensas em solução salina estéril

a 0,9% (p/v) para se obter o inóculo padrão com turbidez equivalente ao tubo 0,5 de McFarland, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (KARAMAN *et al.* 2003).

#### 2.4.2 Teste de difusão em disco

Os ensaios foram realizados em triplicata. Para tal, discos de papel filtro (Whatman – tipo 3) de 6,0 mm de diâmetro esterilizados foram impregnados com alíquotas dos extratos, e armazenados no escuro, à temperatura ambiente, até total evaporação dos solventes. O controle negativo foi preparado utilizando os mesmos solventes empregados para dissolver os extratos. Como controle positivo utilizou-se o disco de azitromicina (15 µg). O inóculo bacteriano padrão foi semeado com swab estéril na superfície da placa de ágar Muller-Hinton e, os discos dispostos com distância mínima de 15 mm entre eles. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Os resultados foram obtidos medindo-se os halos de inibição de crescimento bacteriano formados ao redor dos discos (KARAMAN *et al.* 2003).

### 3 | RESULTADOS

Pela triagem fitoquímica, verificou-se a presença de alcaloides em todos os extratos. Saponinas foram detectadas apenas no extrato metanólico de folhas e casca de *J. spinosa*. Antraquinonas, cumarinas, esteroides, flavonoides, taninos e triterpenoides não foram detectados nos extratos. Quanto a atividade antimicrobiana, o extrato acetato de etila de folhas de *J. spinosa* inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* em 4 mm, respectivamente. O extrato acetônico de casca de *J. spinosa* inibiu apenas o crescimento de *E. coli* em 5 mm. Já o extrato acetônico de folhas de *J. spinosa*, não apresentou atividade antimicrobiana. O extrato metanólico de folhas e casca de *J. spinosa*, não inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. O controle positivo apresentou halo de inibição médio de 5 mm. Enquanto, o controle negativo não apresentou atividade antimicrobiana, conforme esperado.

### 4 | DISCUSSÃO

O perfil fitoquímico dos extratos, detectou a presença de alcaloides, que apresentam significativo potencial antibacteriano (LÔBO *et al.* 2010). Os resultados demonstraram atividade antibacteriana do extrato acetônico de casca de *J. spinosa* frente à *E. coli* e do extrato acetato de etila de folhas frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, a atividade bacteriostática pode ter sido exercida pelos alcaloides detectados na triagem fitoquímica (LÔBO *et al.* 2010). A substância que possui possível atividade bacteriostática está presente no extrato metanólico, no entanto o extrato metanólico de folhas e casca



de *J. spinosa* não apresentou atividade microbiana, tal efeito pode ser decorrente do antagonismo entre as substâncias presentes nesta fração. Alcaloides, possivelmente, apresentam maior ação farmacológica, significativa permeabilidade com a membrana celular, e específica interação com o alvo farmacológico presente na célula bacteriana quando isolado. O controle positivo azitromicina é um antibiótico de uso clínico classificado como macrolídeo caracterizado pela presença de lactonas macrocíclicas de origem policetídis de 15 membros, ligadas a um açúcar e um amino-açúcar (PALJETAK *et al.* 2017). A azitromicina produz sua atividade antibacteriana inibindo a biossíntese de proteínas bacterianas através da ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S (PALJETAK *et al.* 2017). Os extratos acetato de etila de folhas e acetônico de casca de *J. spinosa* podem ter exercido o mesmo mecanismo farmacológico, inibindo a síntese de proteínas bacterianas através da ligação à subunidade ribossômica 50S, a qual deve ser pesquisada futuramente. O extrato acetônico de casca, foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas, no entanto, não apresentou ação bactericida contra bactérias Gram-positivas, o que corrobora com os resultados obtidos em outros estudos (DJIPA *et al.* 2000; FALCÃO *et al.* 2004). Neste sentido, deve-se analisar se o fato ocorre em função da baixa concentração da substância bactericida, ou se o solvente não é adequado para a extração dos princípios ativos.

Os resultados apresentados neste estudo contribuem para pesquisa e descoberta de novos princípios ativos derivados de *J. spinosa*, que possam ser utilizados na síntese de efetivos agentes antimicrobianos contra infecções bacterianas ocasionadas por bactérias resistentes.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos orgânicos de folhas e casca de *J. spinosa*, forneceram informações importantes para o desenvolvimento de novas pesquisas com a espécie perante diferentes bactérias Gram-positivas e negativas. *J. spinosa* demonstrou ser fonte natural para o desenvolvimento de novas substâncias com potencial antibacteriano que podem ser utilizadas na síntese de novos antibióticos, ou como potencializadores da ação antibacteriana de antibióticos existentes.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Artur Berbel Lirio Rondina e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (INCT-HVFF) que conta com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, L.F., ALMEIDA, C.A., CAMARGOS, L.S. A caracterização bioquímica da composição do cerne de Jaracatiá (*Jaracatia spinosa*). **Acta Iguazu**. 2012; 5(4): 65-1.
2. FENNER, R., BETTI, A.H., MENTZ, L.A., RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **RBCF**. 2006; 42(3): 369-94.
3. BREITBACH, U.B., NIEHUES, M., LOPES, N.P., FARIA, J.E.Q., BRANDÃO, M.G.L. Amazonian brazilian medicinal plants described by C.F.P von Matus in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013; 147: 180-9.
4. MUÑOZ, V., SAUVAIN, M., BOURDY, G., CALLAPA, J., ROJAS, I., VARGAS, L., et al. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalaria activity of some plants used by Mosecene indians. **Journal of Ethnopharmacology**. 2000; 69: 139-55.
5. OLIVEIRA, H.V. **Systema de materia medica vegetal**. Rio de Janeiro: Eduardo e Henrique Laemmert; 1854.
6. MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC; 1997.
7. KARAMAN, I., SAHIN, F., GÜLLÜCE, M., OGÜTÇÜ, H., SENGÜL, M., ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and metanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. 2003; 85(2-3): 231-5.
8. LÔBO, K.M.S., ATHAYDE, A.C.R., SILVA, A.M.A., RODRIGUES, F.F.G., LÔBO, I.S., BEZERRA, D.A.C., et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2010; 12(2): 227-33.
9. PALJETAK, H.C., TOMASKOVIC, L., MATIJASIC, M., BUKVIC, M., FAJDETIC, A., VERBANAC, D., PERIC, M. Macrolide hybrid compounds: drug discovery opportunities in anti-infective and anti-inflammatory area. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 2017; 17(5): 1-22.
10. DJIPA, C.D., DELMÉE, M., QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 2000; 71: 307-13.
11. Falcão EPS, Silva NH, Gusmão NB, Ribeiro SM, Pereira EC. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Botanica Brasílica**. 2004; 18(4): 911-8.

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA MACRÓFITA *Hydrocotyle bonariensis* LAM (APIACEAE)

Data de aceite: 01/06/2020

### **Andreza Larissa do Nascimento**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1159276582635745>

### **Joyce Bezerra Guedes**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9585080602890413>

### **Antônia Ângela Bezerra**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4722001752707509>

### **José Fabricio de Carvalho Leal**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5743775508924082>

### **Maria do Socorro Meireles de Deus**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0231968397617981>

### **Ana Paula Peron**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná-  
UTFPR

Campo Mourão, Paraná, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3605560420792065>

### **Márcia Maria Mendes Marques Duque**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1673578415957204>

### **Ana Carolina Landim Pacheco**

Universidade Federal do Piauí-UFPI

Picos, Piauí, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4031662027454518>

**RESUMO:** *Hydrocotyle bonariensis* possui componentes bioativos, tais como, alcaloides, flavonoides, taninos, que proporcionam sua utilização na medicina popular como laxante, diurético, eficaz no tratamento de tuberculose. Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda de *H. bonariensis* utilizando o bioensaio com *Artemia salina* e a citotoxicidade por meio de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. Extratos de *H. bonariensis* foram submetidos ao bioensaio com *A. salina*, para determinar a relação de organismos vivos e mortos. No tempo de 24 horas, foi estimada a  $CL_{50}$  utilizando regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos extratos. Em cada tratamento com *A. cepa* analisou-se 15.000 células. Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. No bioensaio

com *A. salina*, os resultados obtidos mostram que para os extratos da folha e da raiz, os experimentos com menor concentração do extrato, apresentaram um percentual menor de mortalidade. O extrato do caule, não apresentou o mesmo padrão de resposta. Com *A. cepa*, os resultados de IM significativos ( $p < 0,05$ ) foram observados em relação ao controle negativo para a concentração de 1000ppm, em folhas, caule e raízes. Na concentração de 500ppm a IM foi significativo apenas para o extrato do caule, nas demais concentrações não houve valor significativo. Extratos das folhas, caules e raízes de *H. bonariensis* apresentaram componentes bioativos para microcrustáceo *A. Salina*, sendo o caule o mais tóxico. Com *A. cepa*, mostrou que os extratos das folhas, caules e raízes da *H. bonariensis* podem ser citotóxicos na concentração de 1000ppm.

**PALAVRAS-CHAVE:** plantas aquáticas, bioativos, alcaloides, *Artemia salina*, *Allium cepa*

## EVALUATION OF ACUTE TOXICITY AND CYTOTOXICITY OF MACROPHYT

### ETHANOLIC EXTRACTS *Hydrocotyle bonariensis* Lam (APIACEAE)

**ABSTRACT:** *Hydrocotyle bonariensis* has bioactive components, such as alkaloids, flavonoids, tannins, which provide its use in folk medicine as a laxative, diuretic, effective in the treatment of tuberculosis. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity of *H. bonariensis* using the bioassay with *Artemia salina* and cytotoxicity using meristematic cells from *Allium cepa* roots. *H. bonariensis* extracts were submitted to a bioassay with *A. salina*, to determine the ratio of living and dead organisms. At 24 hours, the LC50 was estimated using linear regression obtained from the correlation between the percentage of individuals killed and the concentration of the extracts. In each treatment with *A. cepa*, 15.000 cells were analyzed. Cells in interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase were observed. In the bioassay with *A. salina*, the results obtained show that for the leaf and root extracts, the experiments with lower concentration of the extract, presented a lower percentage of mortality. The stem extract did not show the same response pattern. With *A. cepa*, the results of significant MI ( $p < 0.05$ ) were observed in relation to the negative control for the concentration of 1000ppm, in leaves, stem and roots. In the concentration of 500ppm the IM was significant only for the stem extract, in the other concentrations there was no significant value. Extracts from the leaves, stems and roots of *H. bonariensis* presented bioactive components for microcrustacean *A. Salina*, the stem being the most toxic. With *A. cepa*, he showed that the extracts of the leaves, stems and roots of *H. bonariensis* can be cytotoxic in the concentration of 1000ppm.

**KEYWORDS:** aquatic plants, bioactive, alkaloids, *Artemia salina*, *Allium cepa*

## 1 | INTRODUÇÃO

O homem desde os tempos remotos interage com a natureza e dela retira o que lhe é conveniente, em especial com relação às plantas, como forma de alimento e meio de

sanar as enfermidades. Na antiguidade, todos os medicamentos desenvolvidos para tratar os doentes eram feitos a partir do conhecimento empírico e exercidos pelas mulheres em cada civilização, criando uma cultura popular ao longo das gerações, tendo as plantas como base da produção de medicamentos (BADKE *et al.*, 2012). Devido à procura e preferência por plantas medicinais, intensificaram-se as pesquisas científicas, avaliando as plantas na sua forma bruta ou através de extratos. A segurança de que produtos produzidos a partir de plantas não trazem desvantagens nenhum à saúde, faz parte da crença popular. No entanto, a palavra “natural”, não é garantia de escusa de algum tipo de ameaça para a saúde (PEREIRA, 2013; MARTINS *et al.*, 2014)

Apesar do crescimento e da eficácia das plantas medicinais, o uso de medicamentos que nunca foram testados cientificamente é muito arriscado. As plantas em sua maioria apresentam substâncias tóxicas contra agentes causadores de danos, além do potencial tóxico e carcinogênico elevado, podendo apresentar até mesmo alto potencial genotóxico em alguns casos (DE SA FERREIRA; VARGAS, 1999; DEMMA; ENGIDAWORK; HELLMAN, 2009; FLORINSIAH *et al.*, 2013).

Nos dias atuais, aproximadamente 80% da população mundial utiliza plantas medicinais em cuidados de saúde primários (FRESCURA; LAUGHINGHOUSE; TEDESCO, 2012). Porém, muitas delas não foram suficientemente estudadas, quanto aos seus possíveis efeitos tóxicos (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007). Pesquisas relatam que espécies dos gêneros *Brassica*, *Lathyrus*, *Astragalus*, *Euphorbia*, *Prunus*, *Datura*, *Jatropha*, *Ranunculus*, *Solanum*, *Sorghum*, *Allium*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Melilotus*, *Taxus*, apresentam elevado índice de toxicidade (KHAN *et al.*, 2018). Espécies como *Solanum paniculatum* L. *Ricinus communis* L. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, *Crotalaria retusa* L. utilizadas pela população como medicamento, apresentam histórico de intoxicação (BARRETO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2019).

A utilização de plantas como medicamento é comum tanto para as espécies que têm como habitat os ambientes terrestres, bem como, as que habitam os ambientes aquáticos lânticos ou lóticos. Espécies como *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth., *Lemna aequinoctialis* Welw., *Victoria amazonica* (Poepp.) Sowerby, *Azolla filiculoides* Lam., *Pistia stratiotes* L., *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Polygonum punctatum* Elliot, *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don, *Hydrocotyle bonariensis* Lam. Spreng., são utilizadas frequentemente pela população para o tratamento de vários problemas de saúde (ALVES *et al.*, 2001; OUVIÑA, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015).

*Hydrocotyle bonariensis*, originária do território brasileiro é uma macrófita abundante na América do Sul e amplamente distribuída no bioma Caatinga, no Nordeste brasileiro. Encontrada em ambientes aquáticos lóticos, é uma planta prostrada, perene, popularmente conhecida como “acariçoba” (LORENZI, 2008). Seus componentes bioativos, tais como, alcaloides, flavonoides, taninos, compostos fenólicos e saponinas, proporcionam sua

utilização na medicina popular como laxante, diurético, eficaz no tratamento de tuberculose, amenizando os sintomas de reumatismo e artrite (AJANI *et al.*, 2009). Os flavonoides são um dos grupos mais importante de compostos presentes nos vegetais, estando amplamente presentes, principalmente em angiospermas (SIMÕES *et al.*, 2000), esses pigmentos têm grande função na proteção destes organismos contra agentes oxidantes (LOPES *et al.*, 2000). O consumo de flavonoides é de suma importância, levando em consideração os seus benefícios para a saúde humana (GEBHARDT *et al.*, 2005), taxados como antioxidantes de excelência (NARAYAN; VENKATARAMAN, 2002). Os flavonoides são substâncias capazes de diminuir o stress oxidativo, formados por radicais livres ou levar a extinção de uma reação. Estudos relatam que são capazes de prevenir até mesmo lesões musculares, devido à capacidade de desintoxicar alguns peróxidos (MARTINS; COIMBRA; SCHLICHTING, 2014).

O uso de plantas medicinais pode ser muito eficiente, contudo algumas espécies apresentam em sua composição compostos com efeitos deletérios, tornando-se de suma importância à realização de testes avaliativos. Apesar de apresentar diversas propriedades farmacológicas, na literatura científica são encontradas poucas publicações relacionadas a estudos dos efeitos que possam vir a serem provocados aos indivíduos ao utilizarem a *H. bonariensis* (EVANS, 1992; CARNEIRO, 2007; FLORINSIAH, 2013). Dessa forma, torna-se relevante a avaliação, por meio de bioensaios adequados, porque grande parte da população, principalmente de baixa renda, não tem acesso a medicamentos industrializados e utiliza plantas como esta para tratar e prevenir enfermidades.

Testes de avaliação do potencial tóxico são realizados, objetivando-se a avaliação, prevenção e verificação dos efeitos das substâncias nos sistemas biológicos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Os bioensaios utilizando *Artemia salina* Leach (1819) tem superado a sensibilidade, precisão e simplicidade dos testes por meio de camundongos (PETER *et al.*, 13 1997), permitindo uma avaliação preliminar da toxicidade de forma geral (SIQUEIRA *et al.*, 1998), tornando-se relevante a realização do bioensaios utilizando *A. salina*.

Para uma inteira análise da citotoxicidade, os extratos extraídos de plantas precisam ser estudados em diversos sistemas-testes, em diferentes concentrações e tempos de exposição (PRZEDPELSKA-WASOWICZ; WIERZBIKA, 2011). Os bioensaios com plantas demonstram-se sensíveis, rápidos e simples no acompanhamento dos efeitos tóxicos, a nível celular (HERRERO; PEREZ; FERNÁNDEZ, 2012).

Os bioensaios vegetais são considerados apropriadamente sensíveis e simples, no monitoramento dos efeitos tóxicos a nível celular (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; CAMPOS-VENTURA; MARIN-MORALES; DESK, 2016). Dentre eles, os meristemas de raízes de *Allium cepa* L. (cebola), são considerados no meio científico um eficiente bioensaio para o screening inicial da toxicidade genética, em razão de apresentarem número cromossômico reduzido ( $2n=16$ ), o que favorece a detecção de alterações de fuso mitótico ou aneugênicas, e distúrbios no índice de proliferação celular, sendo aceito

internacionalmente por agências de pesquisa. Os resultados obtidos por intermédio dele demonstram, na maioria das vezes, similaridade satisfatória a aqueles obtidos via sistemas testes animal e em culturas de células (BIANCHI; MONTOVANI; MARINMORALES, 2015). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda de *H. bonariensis* utilizando *A. salina* e a citotoxicidade por meio de células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, na perspectiva que os resultados obtidos possam contribuir para o uso seguro dessa planta pela população.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O município de Picos (Figura 1) está localizado na região Centro/Sul do estado do Piauí, à margem direita do Rio Guaribas, a uma latitude de 7o04'37" Sul e uma longitude de 41o28'01" Oeste. Limita-se ao Norte com os municípios de Dom Expedito Lopes e Santana do Piauí; ao Sul com o município de Itainópolis; ao Leste com o município de Geminiano e ao Oeste com o município de Paquetá (AGUIAR-GOMES, 2004). O clima é caracterizado segundo Köppen do tipo Bsh – quente e semiárido, com estações chuvosas no verão. A precipitação média anual é de 679 mm por ano e a umidade relativa do ar permanece em torno de 60% com decréscimo no período de estiagem. O período chuvoso se estende de janeiro a junho (JACOMINE *et al.*, 1986 apud AGUIAR; GOMES, 2004).



Figura 1. (a) Vista da cidade de Picos e do rio Guaribas, (b) local de coleta dos exemplares de *Hydrocotyle bonariensis*.

Fonte: Prefeitura de Picos (2005)

O município de Picos é banhado pelo Rio Guaribas que nasce no município de São Luís do Piauí, sendo afluente da margem direita do Rio Itaim, que por sua vez é afluente do Rio Canindé, considerado um importante contribuinte do Rio Parnaíba. O Rio Guaribas é um rio típico de regiões semiáridas, no período de chuva costuma apresentar

um aumento considerável no seu volume de água com curta duração.

## 2.2 Coleta do material botânico

Os exemplares de *Hydrocotyle bonariensis* foram coletados no rio Guaribas, bairro Bomba, em agosto de 2019. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e levado para o laboratório de Pesquisa III da Universidade Federal do Piauí, *campus* Senador Helvídio Nunes de Barros – Picos, onde foi preparado para obtenção do extrato.

## 2.3 Obtenção do extrato etanólico bruto das folhas, caule e raízes de *Hydrocotyle bonarie*

No laboratório o material foi lavado, retiradas as partes danificadas, separado em raiz, caule e folhas e colocado sobre papel toalha para secagem. Após esse processo, o material foi cortado em pequenos pedaços e pesado em balança de precisão (Figura 3 a e b). Em frascos de vidro de 500ml foram pesados 127,25g de folhas, 109,85g de caule e 17,50g de raízes. A estes foram adicionados 300ml, 150ml e 200ml de etanol (99,5%) (figura 3 c), respectivamente, permanecendo por sete dias; após esse período a solução resultante foi filtrada utilizando-se funil de vidro simples e papel de filtro (Figura 3 d), a evaporação do solvente se deu por meio do banho-maria a temperatura de 60° C, obtendo-se o extrato bruto das folhas, caules e raízes.



Figura 2. Separação das partes do vegetal para corte e pesagem.

Figura 3. Preparação do material botânico para obtenção do extrato

Fonte: Autora (2019)



## 2.4 Bioensaio de letalidade frente *Artemia salina*

O ensaio de letalidade em *A. salina* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) e Paredes, (2016) com algumas modificações. A princípio foi preparado a água salina, concentração de 30g/L de NaCl de sal marinho sintético, diluída em 1L de água potável, que foi mantida à temperatura ambiente, com recepção de luz artificial de 100W, em aquário improvisado, feito a partir de garrafa PET; em seguida pesou-se 0,3g de cistos de *A. salina* que foram adicionados a água salina no aquário improvisado para aerar por um período de 48 horas até a eclosão dos náuplios.

### 2.4.1 Preparação das diluições seriadas

Foram pesadas em balança de precisão 100mg dos extratos etanólicos bruto, em seguida foi adicionado 100mL de solução salina. As soluções foram mantidas em constante agitação para completa homogeneização. Ao final do processo obteve-se uma concentração de 1000ppm de soluções de cada extrato. A partir das soluções preparadas dos extratos 1000ppm, foram realizadas diluições seriadas de, 500ppm, 250ppm, 125ppm, 62,5ppm. Todo o processo foi repetido igualmente para os três extratos. O controle negativo foi preparado utilizando solução salina e ração para *A. salina*. O controle foi utilizado para se ter certeza de que a morte dos náuplios seria provocada pela toxicidade dos extratos, e não por falta de algum recurso durante a realização do teste; vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata.

### 2.4.2 Exposição dos náuplios

Após 48 horas de eclosão dos cistos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, os náuplios de *A. salina* (n=10), foram transferidos para os tubos nos quais estavam presentes os extratos nas diferentes concentrações. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente e sob iluminação por 24 horas. Após esse período, foram analisados para registrar a quantidade de náuplios vivos e mortos. O número de larvas mortas em cada concentração dos extratos foi utilizado para calcular os valores da  $CL_{50}$  (concentração que mata 50% dos náuplios). Sendo assim, diante dos valores da  $CL_{50}$  obtidos, os produtos testados foram classificados quanto à toxicidade.

### 2.4.3 Análise dos dados

Os extratos etanólicos de *H. bonariensis* foram submetidos ao bioensaio com *A. salina*, onde foi possível determinar a relação de organismos vivos e mortos. Ao final do

ensaio, no tempo de 24 horas, foi estimada a  $CL_{50}$  utilizando regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos extratos.

Preparação das diluições seriadas do extrato etanólico de *Hydrocotyle bonariensis* para análise da toxicidade em nível celular com meristemas de raízes de *Allium cepa*.

Foram pesadas em balança de precisão 500mg dos extratos etanólicos bruto e em seguida foi adicionado 500 mL de solução salina. As soluções foram mantidas em constante agitação para completa homogeneização. Ao final do processo obteve-se uma concentração de 1000ppm de soluções de cada extrato. A partir das soluções preparadas dos extratos 1000ppm, foram realizadas diluições seriadas de, 500ppm, 250ppm. O processo foi repetido para os três extratos etanólicos. O controle negativo foi preparado utilizando água destilada. O controle foi utilizado para se ter certeza de que as alterações cromossômicas seriam provocadas pela toxicidade dos extratos, e não por falta de algum recurso durante a realização do teste.

## 2.5 Testes de citotoxicidade em células de raízes de *Allium cepa*

O bioensaio vegetal com *A. cepa* foi feito com base em Peron *et al.*, (2008). Para a realização das análises de toxicidade, inicialmente bulbos de cebolas foram colocados em copos aerados contendo água destilada à temperatura ambiente ( $\pm 27^{\circ}C$ ) até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento (Figura 4). Para análise de cada amostra (concentração ou tratamento) de extrato estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com a suas respectivas amostras do extrato etanólico de *H. bonariensis* foram coletadas algumas raízes de cada cebola e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram expostas em seus respectivos tratamentos por 24 horas, procedimento denominado de tempo de exposição 24 horas.



Figura 4. Bulbos de *Allium cepa* colocados em copos aerados com água destilada para obtenção de raízes com cerca de 2,0cm

Fonte: Autora (2019)

Após 24 horas foram retiradas algumas raízes e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada bulbo foram devolvidas a seus respectivos tratamentos onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas. Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição 24 e 48 horas foram escolhidos com o intuito de avaliar a ação do extrato em mais de um ciclo celular.

Em cada coleta, foram retiradas três raízes por bulbo. Nesse contexto, seguindo o protocolo proposto por Guerra; Souza (2002) as lâminas, três por bulbo, foram montadas e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 400x. Para cada tratamento foram analisadas 5.000 células para o tempo de exposição 24 horas e 5.000 células para o tempo de exposição 48 horas. Assim, para cada concentração de *H. bonariensis* analisou-se um total de 15.000 células. Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.

A partir desta análise determinou-se o índice mitótico (IM) por meio da seguinte equação (número total de células em mitose ÷ número total de células analisadas) x 100. O valor do IM foi parâmetro para a determinação do potencial citotóxico de *H. bonariensis* nas formas analisadas. Para a análise estatística da citotoxicidade das amostras foi utilizado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ),  $p < 0,05$ .

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 *Artemia salina* Leach

Para o bioensaio com *Artemia salina*, os resultados obtidos (Tabela 1) mostram que para os extratos obtidos da folha e da raiz, os experimentos com menor concentração do extrato, apresentaram um percentual menor de mortalidade. No entanto, com relação ao extrato do caule, não apresentou o mesmo padrão de resposta. Os resultados obtidos por esse tipo de bioensaio asseguram testes posteriores, como os para antioxidantes podendo, portanto, assegurar a aplicabilidade terapêutica de plantas no tratamento de patologias associadas aos radicais livres (MERINO *et al.*, 2015). O bioensaio com *A. salina*, ainda é utilizado em testes com extratos de plantas, para demonstrar o potencial das mesmas como fonte de compostos antibacterianos e justificar, de forma sucinta o uso popular de determinadas espécies (STEFANELLO *et al.*, 2006).

Órgão vegetal	% Mortalidade				
	1000ppm	500ppm	250ppm	125ppm	62,5ppm
Folha	90±0	83,3± 15,2	20± 0	16,6± 5,7	16,6±5,7
Caule	100±0	100±0	83,3±5,7	60±17,3	66,6±11,5
Raiz	100±0	100±0	80±0	33,3±5,7	16,6±5,7

Tabela 1: Percentagem de náuplios mortos de *A. salina* frente à concentração dos extratos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam.

Fonte: Autora (2019)

Os extratos etanólicos obtidos dos caules e raízes tiveram um percentual de mortalidade semelhante nos experimentos onde foram utilizadas as concentrações de 1000ppm e 500ppm, eliminando 100% dos náuplios. Na concentração de 250ppm, os extratos etanólicos dos caules e raízes mantiveram valores aproximados, porém, nas concentrações de 125ppm e 62,5ppm, houve uma redução no percentual de mortes no extrato da raiz, enquanto que no extrato obtido do caule, esses valores se mantiveram elevados. O extrato etanólico das folhas apresentou valores de mortalidade diferentes dos extratos etanólicos obtidos para os caules e para as raízes na maioria das concentrações, exceto para a concentração de 62,5ppm, em que o percentual de mortos foi o mesmo.

Avaliações toxicológicas são de suma importância na seleção de substâncias com atividade biológica, que podem ter utilidade terapêutica, produzindo novos fármacos de acordo com a toxicidade apresentada (CARBALLO *et al.*, 2002).

O ensaio de letalidade com *A. salina* é uma técnica muito utilizada para avaliação prévia da atividade tóxica de extratos de plantas, devido a sua simplicidade, rapidez e baixo custo, sendo eficaz na determinação de atividade antitumoral (MEYER *et al.*, 1982), na avaliação da toxicidade geral, citotoxicidade, e atividade inseticida (LEITE *et al.*, 2009).

As Figuras 5, 6 e 7 mostram a reta de regressão linear obtida através da correlação entre a concentração dos extratos da folha, do caule e da raiz de *H. bonariensis* e a porcentagem de letalidade de *A. salina*. Para uma melhor adequação da reta foram retirados os valores extremos de concentração.

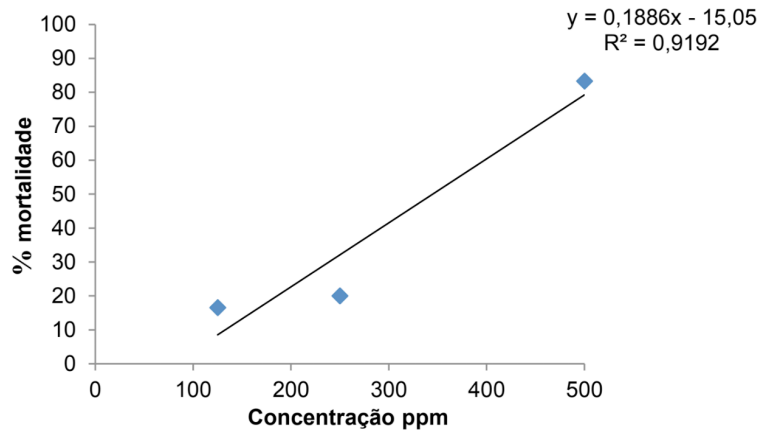


Figura 5: Retas de regressão obtida da correlação entre % mortalidade de *A. salina* versus a concentração do extrato etanólico das folhas de *H. bonariensis* (24 horas)

Fonte: Autora (2019)

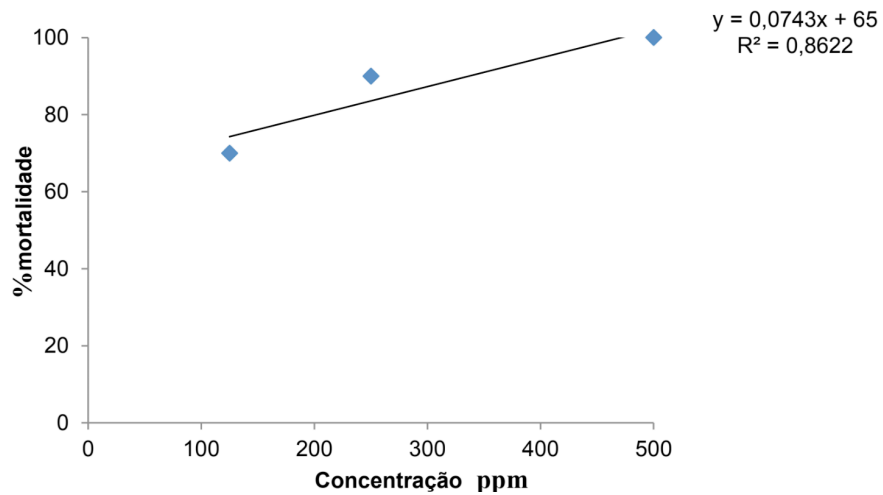


Figura 6: Retas de regressão obtida da correlação entre % mortalidade de *A. salina* versus a concentração do extrato etanólico dos caules de *H. bonariensis* (24 horas)

Fonte: Autora (2019)

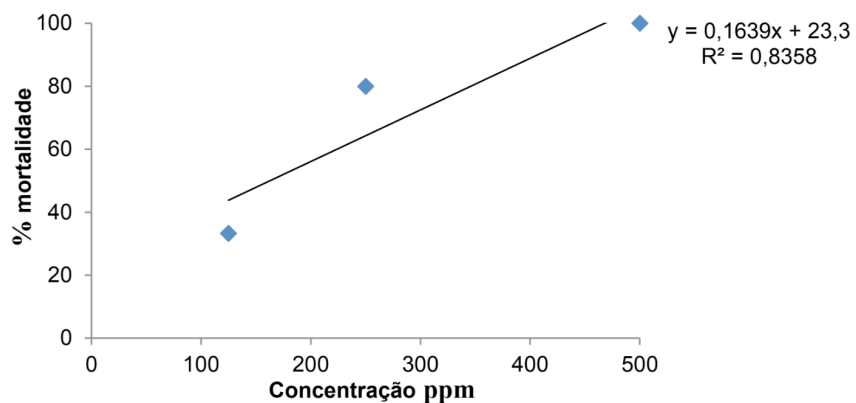


Figura 7: Retas de regressão obtida da correlação entre % mortalidade de *A. salina* versus a concentração do extrato etanólico das raízes de *H. bonariensis* (24 horas)

Fonte: Autora (2019)

Os extratos etanólicos das folhas apresentaram  $CL_{50}=344,9\text{ppm}$ , os dos caules  $CL_{50}=201\text{ppm}$  e os das raízes  $CL_{50}=162,9\text{ppm}$ . Na avaliação da toxicidade de compostos ativos e extratos vegetais para *A. salina*, um valor de  $CL_{50}$  inferior a  $1000\text{ppm}$ , são considerados compostos que apresentam toxicidade, portanto, os extratos podem ser considerados bioativos, pois apresentaram  $CL_{50}$  menor que  $1000\ \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  (MEYER *et al.*, 1982; PARRA *et al.*, 2001, citados por SANTOS; DAVID; DAVID, 2011).

Dolabela (1997) considera uma  $CL_{50}<80\text{ppm}$ , altamente tóxicos; entre  $80\text{ppm}$  e  $250\text{ppm}$ , moderadamente tóxico; e  $CL_{50}>250\text{ppm}$ , com baixa toxicidade ou não tóxico. Os resultados mostraram que os extratos etanólicos do caule e raiz de *H. bonariensis* caracterizam-se como moderadamente tóxicos, pois os valores da  $CL_{50}$  ficaram entre  $80\text{ppm}$  e  $250\text{ppm}$ . No entanto, os extratos etanólicos das folhas de *H. bonariensis* apresentaram  $CL_{50}=344,9\text{ppm}$ , podendo ser considerado com baixa toxicidade, por a  $CL_{50}$  ser um pouco maior que  $250\text{ppm}$ . Análises realizadas por Ouviaña *et al.*, (2009) comprovaram que o extrato aquoso de *H. bonariensis* possui efeito anti-inflamatório, o que sustenta seu uso como planta medicinal, para tratar determinados problemas de saúde.

O bioensaio com *A. salina* é considerado um teste capaz de determinar a atividade de produtos bioativos e de forma previa a atividade antitumoral (ARCANJO *et al.*, 2012). Experimentos utilizando *A. salina* para determinar a toxicidade preliminar de extratos de *Indigofera suffruticosa* Mill para toxicidade *in vivo* em camundongos portadores de carcinomas de Ehrlich (EC) mostraram que extratos moderadamente tóxicos em *A. salina*, tem atividade antitumoral significativa (SILVA; LIMA, 2008).

### 3.2. *Allium cepa* L

Com relação aos experimentos utilizando *A. cepa*, para a avaliação da toxicidade do extrato a nível celular, os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram os índices mitótico (IM) obtidos por meio da seguinte equação (número total de células em mitose ÷ número total de células analisadas) x 100. O IM foi parâmetro para a determinação do potencial citotóxico de *H. bonariensis* nas formas analisadas. Como podem ser observados na tabela, os resultados de IM significativos ( $p<0,05$ ) foram observados em relação ao próprio controle negativo para a concentração de  $1000\text{ppm}$ , em folhas, caule e raízes. Enquanto que na concentração de  $500\text{ppm}$  a IM foi significativo apenas para o extrato do caule, nas demais concentrações não houve valor significativo.

Órgão vegetal de <i>H. Bonariensis</i>	Concentração (ppm)	TE/IM		
		0 h	24 h	48 h
Folha	1000ppm	18,7 <sup>a</sup>	12,3 <sup>b</sup>	11,8 <sup>b</sup>
	500ppm	18,3 <sup>a</sup>	14,0 <sup>a</sup>	13,5 <sup>b</sup>
	250ppm	19,5 <sup>a</sup>	17,5 <sup>a</sup>	15,3 <sup>a</sup>
Caule	1000ppm	20,0 <sup>a</sup>	14,3 <sup>b</sup>	12,8 <sup>b</sup>
	500ppm	18,8 <sup>a</sup>	13,3 <sup>b</sup>	12,8 <sup>b</sup>
	250ppm	17,7 <sup>a</sup>	16,5 <sup>a</sup>	14,3 <sup>a</sup>
Raiz	1000ppm	20,0 <sup>a</sup>	15,3 <sup>b</sup>	13,8 <sup>b</sup>
	500ppm	20,7 <sup>a</sup>	18,8 <sup>a</sup>	17,9 <sup>a</sup>
	250ppm	21,8 <sup>a</sup>	19,3 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>

**Tabela 2** – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *Allium cepa* expostos, por 0h (controle negativo), 24 e 48h, nas três concentrações dos órgãos vegetais de *H. Bonariensis*. Para cada concentração foram apresentados os valores significativos de  $\chi^2$ .

TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; Valores seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si pelo teste  $\chi^2$  ao nível de 5%. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste  $\chi^2$  dos seus respectivos controles negativos.

Fonte: Autora (2019).

De acordo com Caritá; Marin-Morales (2008), a exposição de tecidos de intensa proliferação celular, como meristemas de raízes de *A. cepa*, a compostos químicos que possuem capacidade de causar instabilidade genética, podem desencadear alterações específicas comprometendo o crescimento e o funcionamento das células, bem como dos órgãos atingidos. A inibição na divisão celular na concentração de 500ppm do extrato etanólico do caule e na concentração de 1000ppm do extrato etanólico das folhas, caules e raízes, pode comprovar a presença de compostos que possuem ação tóxica capazes de comprometer a divisão celular, não permitindo o crescimento e a reposição celular do organismo exposto (HERRERO, *et al.*, 2012). A inibição da proliferação celular observada em estudos como estes pode ser provocada por compostos com atividade citotóxicos, presentes na planta testada (GOMES *et al.* 2013; SALES *et al.* 2016; CARVALHO *et al.* 2016).

O sistema teste *Allium cepa* é um biomarcador excepcional para a triagem inicial de citotoxicidade em plantas medicinais devido às suas propriedades cinêmicas de proliferação por cromossomos grandes que são poucos em número ( $2n = 16$ ), e sua confiabilidade e concordância com outros testes de toxicidade, ajudando de forma ampla os estudos de prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; FACHINETTO *et al.*, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os resultados não apresentaram alterações a nível cromossômico, o que corrobora com o estudo de Florinsiah *et al.*, (2013), onde os extratos das partes aéreas e raízes de

*H. bonariensis* não apresentaram efeito mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium*, corroborando com o uso da mesma na medicina popular.

## 4 | CONCLUSÃO

As análises realizadas possibilitaram avaliar a toxicidade aguda e citotoxicidade dos extratos etanólicos das folhas, caules e raízes da *H. bonariensis* utilizada amplamente pela população para sanar enfermidades. A análise dos extratos etanólicos das folhas caules e raízes de *H. bonariensis* constatou que os mesmos apresentaram componentes bioativos frente ao microcrustáceo *A. Salina*, sendo o caule o mais tóxico.

No entanto, a avaliação com sistema teste vegetal *A. cepa*, mostrou que os extratos etanólicos das folhas, caules e raízes da *H. bonariensis* podem ser citotóxicos na concentração de 1000ppm, corroborando com os resultados obtidos em *A. salina*. Embora *H. bonariensis* apresente componentes bioativos, o que corrobora com seu consumo, o presente estudo mostrou que a maior concentração testada tem potencial citotóxico. Logo, os resultados obtidos podem contribuir para o uso seguro dessa planta pela população e fomenta a realização de novos testes, sendo fonte para outros estudos.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. B.; GOMES, J. R. de C. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado do Piauí: diagnóstico do município de Picos**. Fortaleza: CPRM - Serviço Geológico do Brasil, maio, 2004. Disponível: [http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/16362/Rel\\_Picos.pdf?sequence=1](http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/16362/Rel_Picos.pdf?sequence=1). Acesso em: 04 de jun. 2019.

AJANI, E. O. et al. **Chemopreventive and remediation effect of *Hydrocotyle bonariensis* Comm. Ex Lam (Apiaceae) leave extract in galactose induced cataract**. Journal of Ethnopharmacology, v. 123, n.1, p. 134-142, may 2009.

ALVES, A.M. et al. **Polygodial, the Fungitoxic Component from the Brazilian Medicinal Plant *Polygonum punctatum***. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 831-833, aug. 2001.

ARCANJO, D. D. R. et al. **Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine**. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 505-509, aug. 2012.

BADKE, M.R. et al. **Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais**. Texto & Contexto Enferm, Florianópolis, v.21 n. 2, p. 363-370, jun. 2012.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. **Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais**. Rev. bras. farmacogn. João Pessoa, v.17, n. 3, p. 444-447, set. 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. **Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review**. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 109-139, mar. 2006.

BEZERRA, J. J. L.; FALCÃO-SILVA, V. S. **Plantas relatadas como tóxicas para ruminantes no semiárido nordestino**. Rev. Ciênc. Agrovet. Lages, v. 18, n. 2, p. 202-211, fev. 2019.



- BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. **Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture.** J Environ Sci, China, v. 36, n.1, p.102-111, july, 2015.
- CAMPOS-VENTURA, B.; MARIN-MORALES, M. A.; DESK S. **Micronuclei and chromosome aberrations derived from the action of Atrazine herbicide in *Allium cepa* meristematic cells.** SDRP Journal of Earth Sciences Environmental Studies, v. 1, n. 1, p. 22-28, jan, 2016.
- CARBALLO, J. L. *et al.* **Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro citotoxicity in marine natural products.** BMC Biotechnology, v. 2, v.17, p. 2-17, sept. 2002.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. **Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes.** Chemosphere, v. 72, n. 5, p. 722-725, mar. 2008.
- CARNEIRO, D. M. **Ayurveda: Saúde e Longevidade.** Goiânia: Editora UFG, 2007.
- CARVALHO, F. R. S. *et al.* **Are salty liquid food flavorings in vitro antitumor substances?.** An Acad Bras Cienc, v. 88, n.3, p. 1419-1430, oct. 2016.
- DE SA FERREIRA, I. C. F.; VARGAS, V. M. **Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella/microsome* assay.** Phytother. Res., v. 13, n. 5, p. 397–400, sept. 1999.
- DEMMA, J.; ENGIDAWORK, E.; HELLMAN, B. **Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine.** Journal of Ethnopharmacology, v. 122, n. 1, p. 136–142, feb. 2009.
- EVANS, J. P. **The Effect of Local Resource Availability and Clonal Integration on Ramet Functional Morphology in *Hydrocotyle bonariensis*.** Oecologia, v. 89, n. 2, p. 265-276, feb. 1992.
- FACHINETTO, J. M. *et al.* **Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo de celular de *Allium cepa*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. 49-54, mar. 2007.
- FLORINSIAH, L. *et al.* **Mutagenicity Effect of *Hydrocotyle Bonariensis* Extracts in *Salmonella/Microsomen* Assay.** Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res v. 20, n. 2, p. 47-50, june, 2013.
- FRESCURA, V. D.; LAUGHINGHOUSE, V. H. D.; TEDESCOS. B. **Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricate* on the *Allium Cepa* cell cycle.** Caryologia. v. 65, n. 1, p. 27-33, may, 2012.
- GEBHARDT Y, *et al.* **Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae.** Phytochemistry, v. 66, n. 11, p. 1273-1284, may, 2005.
- GOMES P. M.; ALVES, M. **Floristic and vegetational aspects of an inselberg in the semi-arid region of northeast Brazil.** Edinburgh Journal of Botany, v. 6, n. 2, p. 329-346, july, 2009.
- GUERRA, M.; SOUZA. M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** 1 ed. Ribeirão Preto, São Paulo: FUNPEC, 2002.
- HERRERO, O.; PEREZ, J. M. M; FERNÁNDEZ, P. F. **Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test.** Mutation Research, v. 743, p. 20-24, jan. 2012.
- LEITE, J. J. G. *et al.* **Chemical composition toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 2, p. 110-113, apr. 2009.

- LEME, D. M.; MARIN, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application.** Mutation Research, v. 682, n.1, p. 71–81, july, 2009.
- LOPES, R.M. et al. Flavonóides: **Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas** Nova Odessa, SP instituto Plantarum, ed. 4, 640 p., 2008.
- MARTINS, G. S. G., COIMBRA, C., C., B., E., SCHLICHTING, C. L. R. Toxicidade do Goji berry (*Lycium barbarum*). **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 1, p. 87-91, 2014.
- MARTINS, H. F.; CARAUTA, J. P. P. Plantas aquáticas. Classificação e comentários. Atas da Sociedade Botânica do Brasil, v. 2, n. 13, p. 101-104, 1984.
- MERINO, F. et al. **Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westerman* Dusén against *Artemia salina*.** Rev. Bras. Pl. Med., v. 17, n. 4, p. 1031-1040, apr. 2015.
- MEYER, B. et al. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active constituents.** Planta Medica, v. 45, n. 5, p. 31-34, jan. 1982.
- NARAYAN, M. S.; VENKATARAMAN, L. V. **Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in carrot (*Daucus carota*).** Journal Of Food Science, v. 67, n. 1, p. 84-86, july, 2002.
- NASCIMENTO, M. da P. M. do; OLIVEIRA, C. R. F. de; MATOS, C. H. C.; BADJI, C. A. **Effect of aqueous extract of *Prosopis juliflora* on the control of the mite *Tetranychus bastosi* in physic nut.** Rev. Caatinga, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 1054 – 1061, dec. 2018.
- OUVIÑA, A. **Actividad Antiinflamatoria Tópica de Extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae).** Latin American Journal of Pharmacy, v. 28, n. 6, p. 941-944, aug. 2009.
- PAREDES, P. F. M. **Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 16, p. 1-10, apr. 2016.
- PEREIRA, S. S. T. C. **Medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais industrializados e oficializados pelo Ministério da Saúde no Brasil: regulamentação sanitária, abrangência e qualidade dos estudos pré-clínicos e clínicos.** 2013. 344f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.
- PERON, A. P. et al. **Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl. em sistema teste vegetal.** Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR, v. 12, n. 1, p. 51-54, 2008.
- PETER S. E.C. et al. **Ecotoxicology of tropical marine ecosystems.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 16, n.1, p. 12–40, 1997.
- PRZEDPELSKA-WASOWICZ, E. M.; WIERZBICKA, M. **Getting of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells.** Protoplasma, v. 248, n. 4, p.663-671, 2011.
- SANTOS, R. A. F.; DAVID, J. P.; DAIVID, J. M. Atividade citotóxica de extratos polares de seis espécies de Leguminosae. In: **34º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, Florianópolis, 2011.
- SILVA, C. B.; LIMA, V. L. M. **Avaliação da atividade antitumoral em extrato de *Indigofera suffruticosa* Mill.** 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SIMÕES, C. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 6 ed. 1104 p., 2010.

SIQUEIRA, J. M. et al. **Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach**. Revista Química Nova, v. 21, n. 5, 1998.

STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A.; **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochniapoly morphas* sp. floccosa**. Revista Brasileira de Farmacologia, v.16, p. 525-530, 2006.

ZHANG, S; MO, F; LUO, Z; HUANG, J.; SUN, C.; ZHANG, R. **Flavonoid Glycosides of *Polygonum capitatum* Protect against Inflammation Associated with *Helicobacter pylori* Infection**. PLOS ONE, v. 10, n. 5, p. 1-23, may, 2015.

RU, K.; MEHMOOD, S.; SU, K. **Toxic effect of common poisonous plants of district Bannu, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan**. Pak J Pharm Sci. v.

## O ESTADO DA ARTE DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans* E DA CRIPTOCOCOSE

Data de aceite: 01/06/2020

### Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira

Programa de Residência Multiprofissional em Saúde, Especialização em Urgência e Emergência, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil

### Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil

### Benedito Rodrigues da Silva Neto

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil  
dr.neto@ufg.br

**RESUMO:** O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende duas espécies, responsáveis por causar criptococose, sendo a principal manifestação a meningoencefalite em imunocomprometidos. Sua patogenicidade está relacionada aos fatores de virulência. O tratamento desta enfermidade é dificultado devido aos fármacos apresentarem alta toxicidade, resistência do fungo e pouca eficiência terapêutica. Em nossa revisão literária evidenciamos as principais características

deste microrganismo apresentando o estado da arte da taxonomia, biologia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cryptococcus neoformans*, criptococose, virulência, tratamento.

### THE STATE OF THE ART OF THE *Cryptococcus Neoformans* COMPLEX AND CRIPTOCOCOSIS

**ABSTRACT:** The *Cryptococcus neoformans* complex comprises two species responsible for causing cryptococcosis, the main manifestation being meningoencephalitis in immunocompromised hosts. Its pathogenicity is related to virulence factors. The treatment of this disease is difficult because the drugs present high toxicity, resistance of the fungus and little therapeutic efficiency. In our literary review we have highlighted the main characteristics of this microorganism presenting the state of the art of taxonomy, biology, epidemiology, diagnosis and treatment.

**KEYWORDS:** *Cryptococcus neoformans*, cryptococcosis, virulence, treatment

## 1 | INTRODUÇÃO

O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende um grupo de leveduras patogênicas, apresentando como principal e mais grave manifestação clínica processos infecciosos do sistema nervoso central (SNC), resultando em elevados índices de mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Chang & Kwon-Chung 1994; Durski et al. 2013; Meya et al. 2015 those with CM at day 0 (n = 40). Atividade desta levedura no organismo do hospedeiro provoca alterações em consequência da ação de diversos fatores de virulência, que supostamente estão envolvidos na manutenção da infecção e são os responsáveis por desencadear a sintomatologia (Buchanan & Murphy 1998).

Atualmente o tratamento das infecções são realizadas através de alguns antifúngicos, sendo que os principais são fluconazol (FLC), anfotericina B (AmB) e itraconazol (Severo et al. 2009; Ravikant et al. 2015). Estes fármacos apresentam mecanismos de ação específico no ergosterol, que é o esterol componente da membrana celular do fungo, causando desequilíbrio desta estrutura e morte celular (Brajtburg et al. 1996; Li et al. 2015). A utilização destes fármacos causam efeitos colaterais devido a elevada toxicidade e, em consequência ao mal-estar provocado podem prejudicar a continuidade do tratamento (Saag et al. 2000; Ellis 2002; Davis et al. 2015). Outro problema relacionado à terapia desta infecção é o aparecimento de resistência intrínseca (adquirida) de isolados de *C. neoformans* (Ravikant et al. 2015).

Portanto, é necessário a descoberta de novos fármacos como uma alternativa, que propiciem um tratamento eficaz na redução dos efeitos colaterais e uma melhor aceitabilidade pelos pacientes (Saag et al. 2000; Perfect et al. 2010).

### 1.1 Complexo *Cryptococcus neoformans*

Criptococose é uma micose de natureza sistêmica, causada por fungos do complexo *C. neoformans* que compreende duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung & Varma 2006)

#### 1.1.1. Taxonomia

O complexo *Cryptococcus neoformans* por décadas foi agrupado em duas variedades que incluíam 5 sorotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (Ikeda et al 1982; Kwon-Chung et al. 1992; Lengeler et al. 2001; Xu & Mitchell et al. 2003). Quando os teleomorfos das duas espécies foram descobertos, classificaram-se no gênero *Filobasidiella*, sendo *F. neoformans* (sorotipo A e D), e *F. bacillispora* (sorotipo B e C), na família *Filobasidiaceae*, na ordem *Filobasidiales* no filo *Basidiomycota* (Kwon-Chung et al. 1975 & 1976).

A seguir, o uso de ferramentas moleculares classificou as espécies do sorotipo A como uma variedade separada, *C. neoformans* var *grubii*, de espécies de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), baseado na divergência na sequência do gene *URA5* (Franzot et al. 1999; Kwon-Chung 2002)

A genotipagem de numerosas espécies globais de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) *PCR-fingerprinting*, com os primers M13 e (GACA)<sub>4</sub> e (GTG)<sub>5</sub> demonstrou que cada espécie é composta por 4 sub-grupos geneticamente diversos: *C. neoformans* VNI a VNIV e *C. gattii* VGI a VGIII (Meyer et al. 1993 & 1999; Lin & Heitman 2006; Kwon-Chung et al. 2014)

A análise polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), realizada por Boekhout et al (2001), revelaram dois principais agrupamentos genotípicos, correspondendo as espécies *C. neoformans* (genótipos AFLP 1 a 3) e *C. gattii* (genótipos AFLP 4 a 6).

Baseados em diferenças fenotípicas, genéticas, patogênicas e ecológicas, atualmente a taxonomia das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* foi revisada, de acordo com a tabela 1.

<i>C. neoformans</i>	Sorotipo	Genótipo
<i>C. neoformans</i>	A	AFLP1/VNI, AFLP1A/VNB/VNII e AFLP1B/VNII
<i>C. deneoformans</i>	D	AFLP2/VNIV
<i>C. gattii</i>		
<i>C. gattii sensu stricto</i>	B	AFLP4/VGI
<i>C. bacillisporus</i>	C	AFLP5/VGIII
<i>C. deuterogattii</i>	B	AFLP6/VGII
<i>C. tetragattii</i>	C	AFLP7/VGIV
<i>C. decagattii</i>	B	AFLP10
Híbridas		
<i>C. neoformans/C. deneoformans</i>	AD	AFLP3/VNIII
<i>C. gattii sensu stricto/C. deneoformans</i>	BD	AFLP8
<i>C. gattii sensu stricto/C. neoformans</i>	AB	AFLP9

**Tabela 1.** Classificação das duas espécies do complexo *C. neoformans*

Fonte (Bovers 2006 & 2008; Hagen et al. 2015 & 2016).

### 1.1.2. Aspectos morfológicos e biológicos

O complexo *C. neoformans* é composto de células que apresentam forma esférica a ovoide, medindo aproximadamente 3 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, envolvidas por uma cápsula polissacarídica. São leveduras não fermentativas sendo caracterizadas pela habilidade de assimilar inositol como única fonte de carbono, além de produzirem urease (Casadevall & Perfect 1999; Liu et al 2013).

No cultivo em meios de cultura, com ágar Sabourand dextrose (ASD), após 3 dias em temperatura de 25°C a 37°C, a análise macroscópica mostra colônias de cor branca a bege, brilhante com textura cremosa mucoide e margem lisa (Reolon et al. 2004). São observadas algumas diferenças morfológicas, biológicas, bioquímicas e moleculares entre as duas espécies que compõem este complexo (Kwon-Chung et al. 1982).

As espécies do complexo *C. neoformans* produzem leveduras haploides que se reproduzem assexuadamente (forma anamórfica) por brotamento em vida parasitária ou no meio ambiente, e sexuadamente (forma teleomófica) com formação de hifa, basídio e basidiósporos (Kwon-Chung et al. 1976; Mansour et al. 2011).

No meio ambiente as leveduras do complexo *C. neoformans* são encontradas em diversos nichos ecológicos. *C. neoformans* possui distribuição cosmopolita, sendo encontrados em locais contaminados com excretas de aves, ricas em fontes de nitrogênio, ureia e creatinina (Kwon-Chung et al. 1984; Gomes et al. 2010) enquanto *C. gattii* é encontrado predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas em resíduos de matéria orgânica vegetal dispersos no ambiente e habitualmente na espécie *Eucalyptus camaldulensis* (Ellis & Pfeiffer 1990).

Utiliza duas vias de metabolização, a síntese ou catabolismo, utilizando o inositol exogenase para converter o inositol em ácido hialurônico que também auxilia na virulência, ao substituir as manoses estruturais para a formação da cápsula polissacarídica (Molina et al. 1999). Além do inositol, assimilam outros carboidratos como glicose, maltose, sacarose e galactose (Benham 1955; Bowman & Ahearn 1976; Reolon et al. 2004). Ambiente de pH alcalino favorece a produção de amônia, a partir da atividade da enzima creatinina deaminase, que favorece a degradação da creatinina em metidationa e amônia (Kwon-Chung et al. 1982).

O mecanismo de infecção no homem ocorre a partir da inalação de leveduras dessecadas ou de basidiósporos dispersos no meio ambiente, que atingirão as vias respiratórias e estabelecerão um processo infeccioso nos pulmões (Del Poeta & Casadevall 2012). Em hospedeiros normais, a resposta imune efetiva ocorre através de macrófagos alveolares ativados, eliminando a maioria das células fúngicas inaladas (Del Poeta & Casadevall 2012). Por outro lado, em hospedeiros imunocomprometidos, as células criptocócicas desenvolvem infecção local, proliferam e disseminam através da via hematogênica, apresentando um tropismo pelo SNC, onde se adaptam e causam a meningoencefalite (Severo et al. 2009)

## 1.2. Fatores de virulência

As infecções fúngicas geralmente são encontros acidentais no ciclo de vida do fungo e, é provável que existam muitos fatores que permite a sua sobrevivência e multiplicação no hospedeiro, importantes para sua capacidade patogênica. Estes fatores são estratégias

para sobrepor o ambiente hostil do hospedeiro e são denominados de fatores de virulência.

A presença de fatores de virulência são características clássicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, pois estão vinculados com a patogenicidade e regulados através do controle genético do fungo (Steinbach et al. 2007). Dentre estes fatores, destaca-se a capacidade de crescimento da levedura em ambiente com temperatura 37°C, cápsula polissacarídica, produção da melanina e algumas enzimas como a, fosfolipase, proteinase, urease, hemolisinas e DNase (Buchanan & Murphy 1998).

### 1.2.1. Temperatura

O crescimento em elevadas temperaturas é uma das características de virulência de *C. neoformans*, que tem seu crescimento a 37°C associado a uma atmosfera de aproximadamente 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e pH entre 7,3 a 7,4 (Kwon-Chung et al. 2014). Um gene que codifica a subunidade catalítica da calcineurina A, *CNA1* está relacionado a esta característica que permitem sobrevivência a esta temperatura. A relação do gene *CNA1* com a capacidade de crescimento a 37°C foi avaliada em leveduras com e sem deleção deste gene, em temperaturas de 24°C, 37°C e 39°C. Ao analisar a expressão gênica através da técnica de PCR na ausência deste gene, foi observado que o crescimento das leveduras de *C. neoformans* foram abolidas em temperaturas elevadas (Odom 1997).

A calcineurina A é uma serina-treonina fosfatase específica, que é ativada pelo cálcio calmodulina (Ca<sup>+</sup>) e está envolvida em resposta ao estresse em leveduras, apresentando papel fisiológico importante tanto nas leveduras como nos fungos filamentosos (Rasmussen et al. 1994; Yoshida et al. 1994). A deleção do gene que codifica a subunidade catalítica da calcineurina A em *C. neoformans* leva a inibição do crescimento em temperaturas elevadas (Odom 1997).

### 1.2.2. Cápsula polissacarídica

Uma característica que difere as espécies do complexo *C. neoformans*, de outras leveduras de importância médica é a presença da cápsula polissacarídica (Mitchel & Perfect 1995; Frases et al. 2008; Kumar et al. 2011). A presença desta estrutura é determinante para virulência de *C. neoformans*, favorecendo a sua sobrevivência e, que associada a outros fatores, possibilitando o estabelecimento da infecção (Kwon- Chung 1986).

A cápsula é formada por mecanismos complexos que utilizam diversas moléculas com propriedades auto degradante, que influenciam na constituição da sua estrutura (McFadden 2006). Polímeros de polissacarídeos são os principais componentes, sendo que a glucuronoxilomanana (GXM) representa em 90% da estrutura e galactoxilomanana (GalXM) 7% e possui ainda 3% de manoproteínas (MP) (Bose 2003; Zaragoza 2009).



A GXM possui peso molecular variando entre 2000 a 7000 kDa, enquanto a GalXM aproximadamente 100 kDa (Coenjaerts 2006).

A diversidade molecular da cápsula polissacarídica caracteriza as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* em variedades sorotípicas (Zaragoza 2009) (Figura 1). O sorotipo D apresenta a GXM com uma cadeia  $\beta$ -1,2 ligada a resíduos de xilose, o sorotipo A duas ligações  $\beta$ -1,2 ligada a resíduos de xilose e os sorotipos B e C possuem  $\beta$ -1,4 ligada a resíduos de xilose e  $\beta$ -1,2-ácido glicurônico em todos os grupos sorotipos (Klutts 2007).

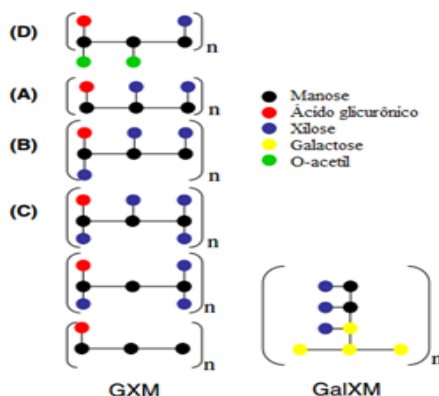


Figura 1. Componentes da estrutura da cápsula polissacarídica. GXM-glicuroxilomanana e GalXM-galactomanana (adaptado de Janbom 2001)

As manoproteínas (MPs) são glicoconjugados que usualmente contém 80 a 90% de manoses, expressas na superfície do fungo e liberada durante o crescimento. São conhecidas duas MPs isoladas de *C. neoformans* (MP1 e MP2) que são responsáveis por induzir uma resposta imunológica pelos monócitos humanos produzindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 12 (IL12) (Pietrella 2005).

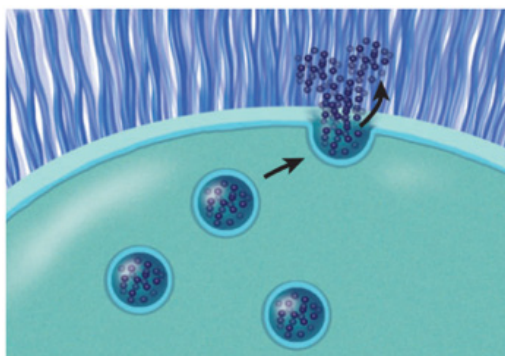


Figura 2. Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma que atravessam a parede celular para formarem a cápsula (adaptado de Doering 2009)

Doering (2009) sugere que a síntese da cápsula polissacarídica pode ser realizada através de subunidades individuais de GXM que são geradas e interligam-se, ou pela

formação dos segmentos de polímero que podem ser gerados, quer na forma madura ou como um precursor (Figura 3).



Figura 3. Modelos de síntese da cápsula polissacarídica no *C. neoformans*, através da união de subunidades (a) e via seguimentos de polímeros (b) (Doering 2009).

Quando as leveduras estão expostas no ambiente, a cápsula fornece proteção a dessecação e/ou contra predadores naturais como nematoides ou amebas e, entre estes a *Acanthamoeba castellanii* que é responsável por fagocitar e matar as espécies *C. neoformans* e *C. liquenfaciens* (Araujo et al. 2012; Almeida et al. 2015).

Em hospedeiros mamíferos, a cápsula polissacarídica exerce diversas funções como atividade antifagocitária e oxidativa contra células da imunidade, além de favorecer a formação de biofilme (Martinez & Casadevall 2006; Araujo et al. 2012; Almeida et al. 2015).

Ao ser fagocitado *C. neoformans* libera vesículas contendo polissacarídeos, que interagem ao redor do fagossoma promovendo uma disfunção e ocasionando a morte dos macrófagos. Estes resultados relacionam a cápsula como uma agressina intracelular e os polissacarídeos como um componente tóxico envolvido na citotoxicidade de macrófagos (Feldmesser et al. 2000).

O GXM é o principal constituinte da cápsula de *C. neoformans*, sendo também o constituinte da matriz polimérica extracelular do biofilme. Estudos comprovam que o polissacarídeo capsular é necessário para a formação do biofilme (Martinez & Casdevall 2007).

Em estudos das infecções pulmonares primárias foi observado que as leveduras apresentaram alterações estruturais em seu diâmetro, que variaram até 100  $\mu\text{m}$ , denominadas de células titãs. Essa mudança morfológica no tamanho das células afeta patogenicidade do fungo por diminuir a fagocitose, reduzindo sua disseminação ao SNC, aumentando a resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo (Okagaki 2010).

Gene	Proteína	Localização	Função	Referência
<b>CAP10</b>	cap10	Citoplasma	Formação da cápsula Auxilia a atividade da xilosiltransferase	(Tefsen et al. 2014)
<b>CAP59</b>	cap59	Desconhecida	Formação da cápsula Secreção de componentes incluindo o GXM	(García-Rivera et al. 2004)
<b>CAP60</b>	cap60	Membranas nuclear e plasmática parede celular	Formação da cápsula	(Janbon 2004)
<b>CAP64</b>	cap64	Desconhecida	Formação da cápsula	(Chang et al. 1996)

Tabela 2. Características dos genes relacionados com a produção de cápsula pelo complexo *Cryptococcus neoformans*

A inativação dos genes *CAP* resultam em um fenótipo acapsular. Produtos específicos desses genes *CAP* na biossíntese da cápsula ainda não estão bem estabelecidos, mas todos compartilham homologia com enzimas envolvidas na biossíntese de polissacarídeo (glicosiltransferase) e/ou modificações. As glicosiltransferases catalisam a transferência de fração de monossacarídeos de um doador de açúcar ativado, para um diferente acceptor molecular em ligação particular, e este processo ocorre frequentemente dentro da via retículo endoplasmático-Golgi.

### 1.2.3. Melanina

A melanina é um polímero de capacidade multifuncional, caracterizado por ser de coloração variável (escura a amarelada), sendo formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou endólicos. É classificada como eumelanina, formada através de polimerização de radicais livres, a feomelanina é derivada de moléculas de tirosina ou cisteína e alomelanina constituída de derivados livres de azoto (Hamilton & Gomez 2002). O esquema de biossíntese da melanina está representado na figura 4.

A habilidade de sintetizar este pigmento através da catalise realizada pela lacase na presença de substratos fenólicos, como a 3,4-dihidroxyfenilalanina (L-DOPA) (Casadevall et al. 2000). A expressão dos genes *LAC1* e *LAC2* são responsáveis pela produção da síntese da enzima lacase, sendo que o principal é *LAC1* (Pukkila-Worley et al. 2005).

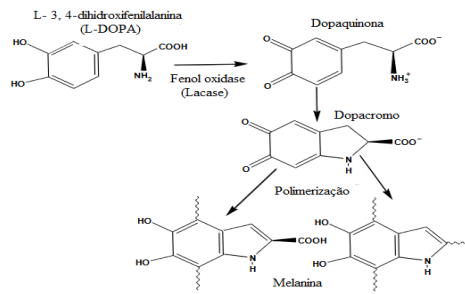


Figura 4. Esquema da melanogênese em *C. neoformans* (adaptado de Williamson et al. 1998).

A melanina é formada por moléculas com alto peso molecular, carregadas negativamente, resistentes a corrosão ácida e sensível a degradação por soluções alcalinas fortes. Possui propriedades hidrofóbicas, insolúveis em soluções aquosas e solventes orgânicos (Casadevall et al. 2000; Urán & Cano 2008) (Figura 5) (Eisenman et al. 2005).

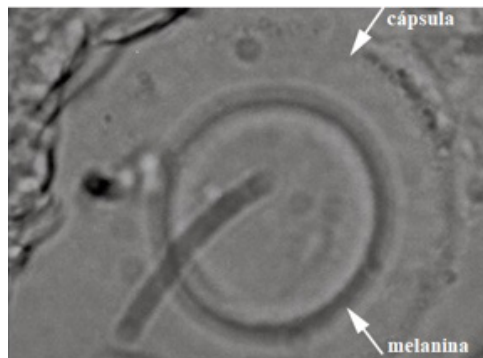


Figura 5. Célula de *C. neoformans* melanizadas visualizada por microscopia de campo brilhante com imunohistoquímica (adaptado de Nosanchuk et al. 1999).

A produção de melanina por células de *C. neoformans* possuem importância na proteção, manutenção da patogenicidade e aumento da virulência (Pedroso et al. 2007; Mandal et al. 2007; Menezes et al. 2011).

Este pigmento auxilia a levedura na proteção contra fatores ambientais como a biodegradação, ação de enzimas líticas, exposição à radiação ultravioleta (UV), temperaturas extremas, predação por microrganismos e ação de metais pesados (Figura 5) (Butler et al. 2005; Urán & Cano 2008).

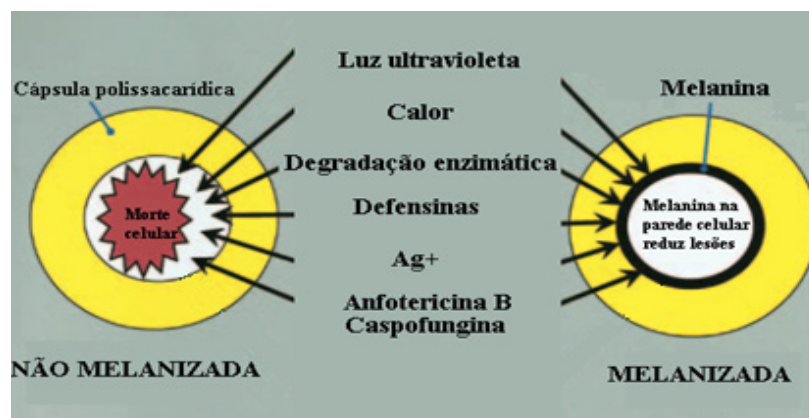


Figura 6. Melanina na parede da célula de *C. neoformans* forma uma barreira física entre o meio exterior e a membrana da célula, protegendo-a de agressões letais (adaptado de Nosanchuk & Casadevall 2003).

A produção de melanina atua de forma imunomoduladora possuindo propriedades pró e anti-inflamatórias, protegendo a célula fúngica dos mecanismos de ação dos macrófagos, interferindo na via alternativa do complemento e participando da diferenciação das células T do tipo 2 (Mednick 2005).

#### 1.2.4. Produção de enzimas

Diferentes enzimas têm sido detectadas em células de *C. neoformans* e no sobrenadante de meios de cultura, contendo proteases, lipases e superóxido dismutase, estando associadas com a virulência de muitos microrganismos. No meio ambiente o fungo elabora essas enzimas para obter nutrientes. Entretanto, quando secretadas durante a infecção, podem destruir tecidos, interferir nos mecanismos de defesas do hospedeiro e contribuir para a virulência (Casadevall & Perfect 1998).

A atividade da fosfolipase e proteinase são consideradas importantes fatores relacionados com a atividade patogênica do *C. neoformans* (Chen et al. 1997; Vidotto et al. 2000), assim como outras exoenzimas como a Dnase extracelular, hemolisinas (Luo et al. 2001; Sánchez & Colom 2010) e urease (Olszewski et al 2004).

##### 1.2.4.1. Fosfolipase

A fosfolipase, formada por um grupo heterogêneo de enzimas, que hidrolisam uma ou mais ligações éster, em glicerofosfolipídeos, são os maiores componentes da membrana da célula e surfactante pulmonar (Djordjevic 2010).

A atividade da fosfolipase auxilia o microrganismo na obtenção de nutrientes e, quando infecta o hospedeiro, causa lesões teciduais através da hidrólise de fosfolipídios da membrana celular. Dessa forma esta enzima atua interferindo nos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como contribui para invasão tecidual, disseminação hematogênica

e para a disseminação do fungo (Casadeval & Perfect 1999; Santangelo et al. 2004)

Estudos sobre *C. neoformans* determinaram atividade de 5 tipos de fosfolipases: A1, A2, B, C e D, sendo que a B e C estão associadas no desenvolvimento da patogenicidade (Figura 7).

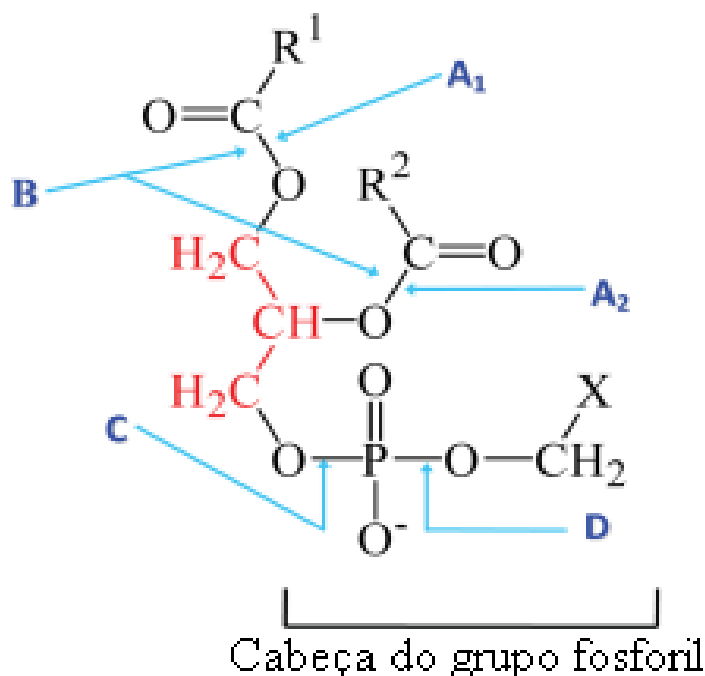


Figura 7. Locais de clivagem da enzima fosfolipase (adaptado Djordjevic 2010).

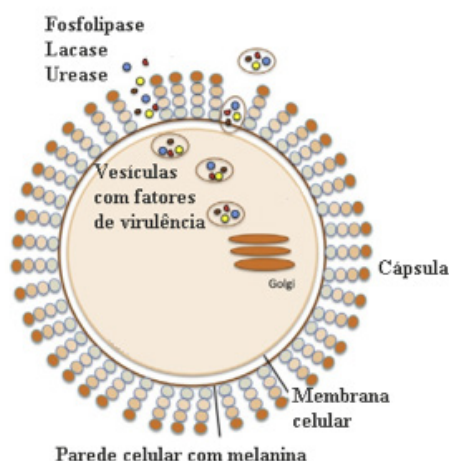


Figura 8. Célula de *C. neoformans* secretando enzimas (adaptado de Coelho et al. 2014).

Segundo Evans et al. (2015) a expressão do gene *PLB1* favorece a síntese da fosfolipase B (PLB) por *C. neoformans*, atuando de forma multifuncional em processos infecciosos localizados no pulmão, onde degrada o principal componente do surfactante pulmonar, o dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC), favorecendo a instalação da infecção (Ganendren et al. 2006).

A fosfolipase C (PLC) é produto da expressão dos genes *PLC1* e *PLC2*

(Chayakulkeeree et al. 2008). Esta enzima juntamente com o fosfolípido fosfatidilinositol (PI), atua na remoção de grupos polares de PI ancorados nas proteínas da membrana e parede celular fúngica, resultando em produtos que realizam a transdução de sinais secundários, que interferem na imunomodulação do hospedeiro (Djordjevic 2010).

#### 1.2.4.2. *Proteinase*

As proteinases são descritas como importantes para a virulência de patógenos bacterianos e fúngicos, tendo sido descrito em isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (Brueske 1986; Casadevall & Perfect et al. 1998; Ruma-Haynes et al. 2000).

A atividade da proteinase está relacionada com a patogenicidade de *C. neoformans* por degradar proteínas, como colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas, fatores do complemento (Chen et al. 1996), causando danos nos tecidos do hospedeiro (Salkowski & Balish, 1991) e fornecendo a nutrição do patógeno (Naglik et al. 2003).

Dessa forma, a proteinase é considerada um fator determinante para a manutenção da infecção e disseminação fúngica no hospedeiro (Chen et al. 1996; Kwon-Chung & Varma 2006; Junior et al. 2013).

#### 1.2.4.3. *Urease*

A urease é uma enzima que atua hidrolisando a ureia em amônia e carbamato com liberação de nitrogênio, para ser usado como fonte nutriente (Cox et al. 2000) e promovendo um aumento de pH do tecido infectado, causando lesão celular, levando a uma alteração da permeabilidade e transmigração tecidual (figura 9) (Rappleye & Goldman 2006; Shi et al. 2010).

A ureia está presente no fluido de revestimento epitelial dos pulmões e, a ação da urease produzida por *C. neoformans* ao converter em amônia, promove inibição da função imunológica por prejudicar a função fagocitária e causando danos no tecido pulmonar (Rutherford 2014).

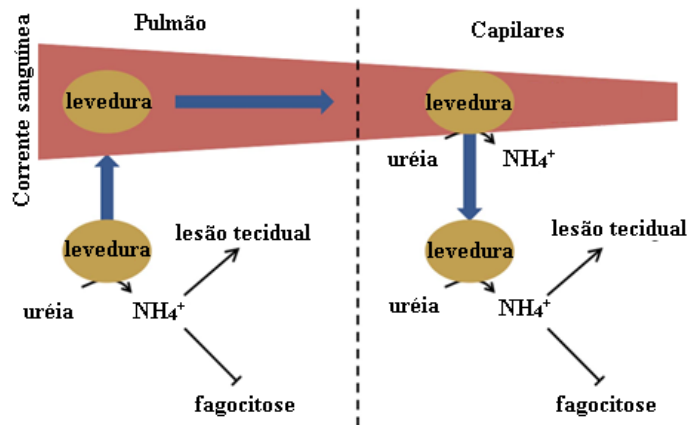


Figura 9. Papel da enzima urease durante infecção fúngica nos pulmões (adaptado de Rutherford 2014).

A produção de urease por *C. neoformans* tem um importante papel na sua disseminação ao cérebro e causando a meningoencefalite. Esta enzima promove o sequestro de *C. neoformans* dentro dos microcapilares, que parece ser uma etapa crítica para a disseminação ao SNC.

#### 1.2.4.4. Hemolisinas

A habilidade de microrganismos patogênicos de adquirir ferro é de fundamental importância na sua sobrevivência e capacidade de estabelecer a infecção no hospedeiro. Uma vez que não existe nenhum ferro livre no hospedeiro humano, a maioria dos agentes patogênicos o adquire de forma indireta, através dos compostos de ferro comumente disponíveis, como o hemoglobina. Para isso, o patógeno deve possuir um mecanismo para destruir a fração heme (onde o ferro está ligado na hemoglobina), permitindo a extração do ferro. As enzimas que medeiam essa atividade são classificadas como hemolisinas. Em humanos, a maior quantidade do ferro é encontrado intracelularmente na ferritina ou em compostos contendo heme. Uma pequena quantidade extracelular de ferro é encontrado em proteínas transportadoras, como a transferrina e lactoferrina (Manns et al 1994; Luo et al 2001).

A presença dessas substâncias é importante para manutenção da infecção, principalmente por leveduras de importância médica, como as espécies do complexo *C. neoformans* (Linares et al. 2007). Nas leveduras do gênero *Candida*, sugere-se que as manoproteínas presente na parede celular, estejam relacionadas com a atividade hemolítica contra as células do hospedeiro (Luo et al 2001).

#### 1.2.4.5. DNase

A DNase é produzida por *C. neoformans* e sua virulência está relacionada a degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA), que é secretado por neutrófilos como



parte da resposta imune inata do hospedeiro e fornecendo nucleotídeos (Sánchez & Colom, 2010). Pesquisa envolvendo vários tipos de leveduras, sugere a correlação entre atividade de urease e a produção de DNase esta relacionada com a virulência dos fungos (Sen et al., 1979).

### 1.3. Criptococose

A criptococose é uma doença fúngica causada por leveduras do complexo *C. neoformans* que caracterizada por ser uma das principais causas de meningite/meningoencefalite, sendo que em pacientes imunocomprometidos com evolução grave e fatal (Li & Mody 2010).

Após a inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos disperso no ambiente, o hospedeiro pode desenvolver quadro assintomático ou sintomático (Severo et al. 2009). A infecção primordialmente ocorre nos pulmões ou o fungo pode manter-se latente, com formação de nódulos granulomatosos ou disseminar por via hematogênica e de alcançar outros tecidos (Figura 10) (Severo et al. 2009).

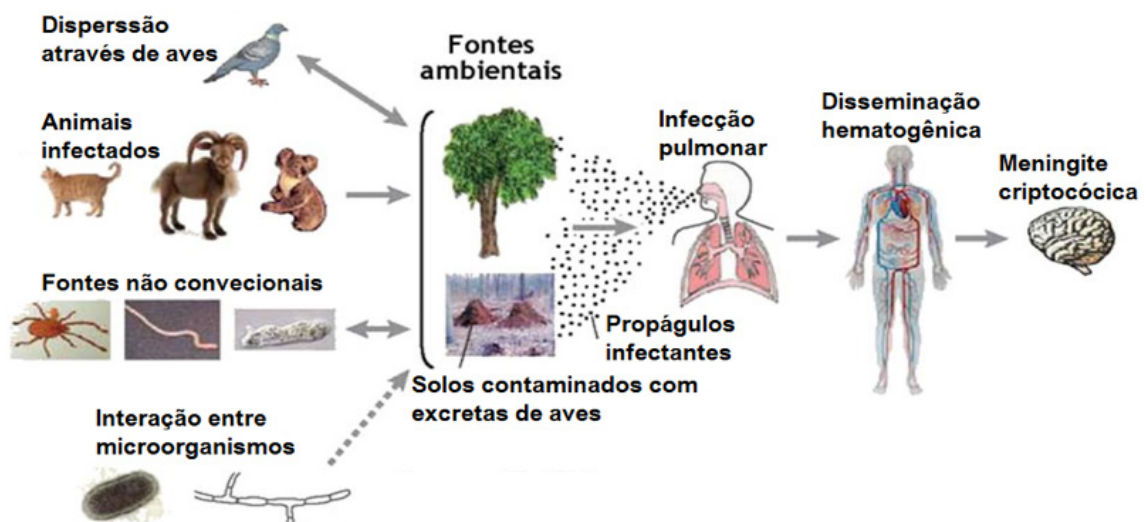


Figura 10. Ciclo da criptococose (modificado de Li & Mody 2010).

O patógeno pode desenvolver processos inflamatórios em tecidos do SNC, acompanhado ou não de lesão pulmonar, suprarrenal, rins, ossos, pele e entre outros (Kon et al. 2008).

A principal complicação da doença ocorre em processo devido ao acometimento do SNC, causando meningoencefalite, com sinais clínicos de febre, mal-estar, cefaleia, distúrbio visual, confusão mental, papiloedema, alterações de nervos cranianos e aumento da pressão do fluido cerebral (Feldmesser et al. 1996; Jarvis & Harrison 2007).

Os indivíduos que apresentam maior pré-disposição para adquirir a doença são aqueles em tratamento com imunossuppressores, imunocomprometidos, especialmente os indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Ishii et al. 2015),

com manifestações cutâneas mais frequentes em pacientes imunocomprometidos, especialmente para pacientes HIV- positivo, podendo apresentar sintomas de múltiplas lesões, de forma acneiforme, nodulares, herpetiniforme, tipo celulite e queloides com presença de eritema (Nasser & Filho 2011).

### 1.3.1. Diagnóstico

O diagnóstico da criptococose é realizado através do auxílio de exames laboratoriais, utilizando técnicas como o exame direto (ED), biopsia, cultura, sorologia, diagnóstico molecular e exames de imagem.

As amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico são: líquido cefalorraquidiano (LCR), escarro, biopsia de tecidos, lavado brônquico, sangue, raspado de lesões cutâneas, urina, secreção prostática e amostra de medula (Mitchell & Perfect 1995; Gazzoni et al. 2008).

O exame direto é realizado utilizando a tinta da China ou tinta nanquim que permite visualizar a cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. Este método é mais acessível, pois é de baixo custo, com sensibilidade de 80% em casos de meningite criptocócica em pacientes imunocomprometidos com SIDA (Severo et al. 2009; Perfect 2014).

A cultura é realizada em meio de ágar Sabouraud dextrose (ASD), para o isolamento de espécies do complexo *C. neoformans*. Após a incubação entre 25°C e 37°C, por 72 horas, se observa o crescimento de colônias mucoides com coloração creme ou branca. A diferenciação entre as duas espécies deste complexo se baseia na habilidade do *C. gattii* em assimilar a glicina, apresentando resistência à canavanina quando submetido em meio canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). A cultura de LCR para pesquisa de *Cryptococcus* é positiva em 89% dos pacientes sem infecção pelo HIV e em 95-100% dos pacientes acometidos por SIDA (Kon et al. 2008).

A partir do exame histopatológico é possível observar microestruturas específicas de *Cryptococcus*, através das colorações de hematoxilina eosina (HE), coloração pela prata Gomori (GMS), mucicarmim de Mayer e Fontana Masson (Gazzoni et al. 2009).

A sorologia é realizada pela a detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus*, através da reação de aglutinação em látex, pode ser realizada utilizando LCR e soro, onde a positividade é maior que 90% nos pacientes com SIDA (Kon et al. 2008).

*C. neoformans* e *C. gattii* podem ser detectados e identificados a partir de espécimes clínicos e culturas, baseado em sequências específicas de genes. Entre as principais técnicas de identificação estão a hibridação, que foi pioneira na identificação molecular do fungo e no desenvolvimento de sondas específicas para detecção de patógenos; PCR e outros métodos baseados em PCR, sequenciamento de regiões genômicas específicas, que são amplificadas através de PCR são uteis para o diagnóstico da criptococose (Sidrim

et.al. 2010).

Os exames de imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética são ideais para visualização de complicações, do tipo hidrocefalia ou lesões em massa (Subramanian & Mathai 2005).

### 1.3.2. Tratamento

O tratamento dos pacientes com diagnóstico de criptococose devem ser realizados de acordo com as manifestações clínicas. Os fármacos mais utilizados são a AmB e os derivados azólicos, como FLC (Saag et al. 2000).

AmB, com estrutura química representada na figura 11, e a anfotericina na forma lipossomal (constituída do complexo lipídico) são os derivados polienos disponíveis para o tratamento de criptococose (Nooney et al. 2005; Valdés 2005). Estes fármacos apresentam como mecanismo de ação, a ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, desencadeando a sua despolarização, disruptura, alterando a permeabilidade com a perda de componentes essenciais para a sobrevivência celular (Figura 12) (Davey et al. 1998; Chen et al. 2015).

Administração deste fármaco é recomendado em situações de alta gravidade, principalmente em casos de comprometimento do SNC, mas é necessário levar em consideração o risco de efeitos colaterais, como nefrotóxico (Perfect et al. 2010).

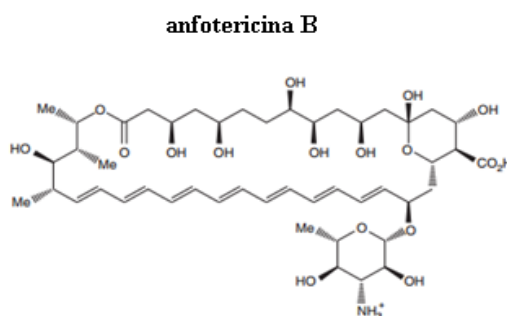


Figura 11. Estrutura química da AmB (adaptado de Roemer & Krysan 2014).

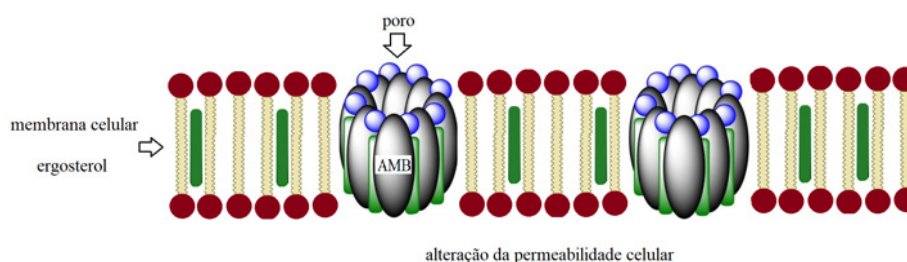


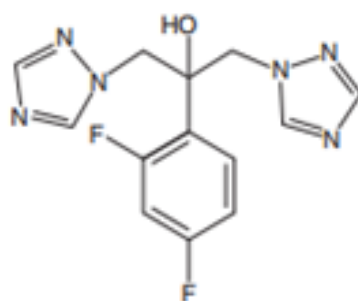
Figura 12. Mecanismo de ação da AmB que se liga ao ergosterol da membrana levando a formação de poros (adaptado de Palacios et al. 2011).

Atividade tóxica da AmB tem sido relacionada com a ligação deste fármaco com o colesterol da membrana celular, sendo este o responsável por manter a estabilidade e integridade da célula humana, podendo desenvolver toxicidade aguda ou crônica (Hoeprich 1992).

A nefrotoxicidade é considerada um fator de grave comprometimento nas terapias antifúngicas, devido ao desenvolvimento da insuficiência renal que é considerada de alta gravidade para os pacientes (Deray 2002).

Foi observado que AmB em dispersão coloidal é bem tolerada em administração de dose única em voluntários saudáveis. Entretanto, o aumento progressivo da concentração causa o aumento da ocorrência de efeitos colaterais, como vômitos, náusea, calafrio, taquicardia e febre (Sanders et al. 1991; Filippin & Souza 2006).

O FLC é um derivado do grupo azólico, com ação fungistática, cujo mecanismo de ação é promover uma alteração da biossíntese do ergosterol, induzindo a não formação desta estrutura que é um, 2º componente da membrana do fungo (figura 13). Atua competitivamente inibindo a lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase impedindo a formação do ergosterol, levando a um acúmulo de lanosterol e diminuição do ergosterol, resultando em uma membrana celular fúngica defeituosa, prejudicando a sobrevivência da célula (Figura 14) (Nooney et al. 2005; Giavini & Menegola 2010; Ferreira et al. 2013).



**fluconazol**

Figura 13. Estrutura química do FLC (adaptado de Roemer & Krysan 2014)

A utilização deste fármaco apresenta algumas limitações, como a pouca eficiência contra fungos filamentosos, resistência natural em *Candida Krusei* e resistência adquirida contra espécies de *Candida* e *C. neoformans* (Fica 2004).

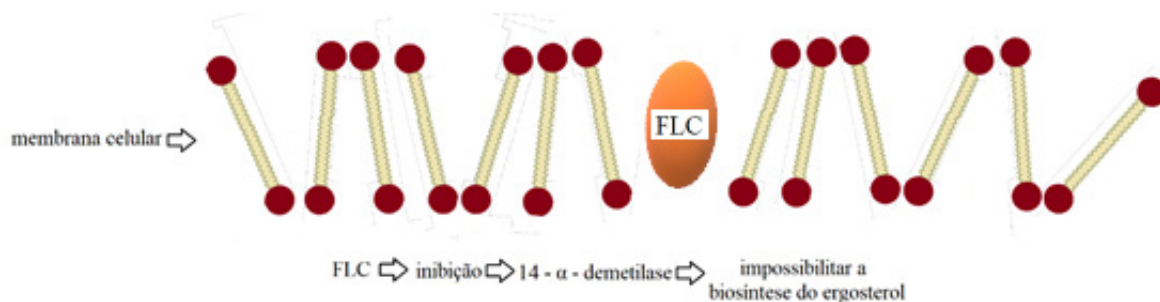


Figura 14. Mecanismo de ação do FLC na membrana celular (adaptado de Palacios et al. 2011).

Recomendável a prescrição do FLC para paciente na fase inicial da infecção, especificamente quando as manifestações clínicas estão localizadas a nível pulmonar (Santos et al. 2014). Este fármaco é considerado de baixa toxicidade (Fica 2004), sendo que os principais efeitos adversos estão envolvidos com a intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade (Martinez 2006).

Esse fármaco tem sido administrados como profilático no controle de infecções fúngicas (Logu et al. 2005) e como consequência o risco dos isolados adquirirem resistência, contribuindo para insucesso do tratamento.

### 1.3.3. Resistência aos antifúngicos

A falha no tratamento da criptococose pode ocorrer, e está relacionada com diversos fatores como as doenças subjacentes, intolerância aos fármacos, comprometimento da farmacocinética do medicamento e a resistência primária ou secundária de *C. neoformans* aos antifúngicos (Perfect & Cox 1999).

A resistência primária do microrganismo é caracterizada por desenvolver de forma natural, sem que haja exposição aos fármacos e a secundária acontece de forma adquirida, ocorrendo mediante a exposição ao antifúngico ou dependente de alterações genéticas (Kanafani & Perfect 2008). A utilização indiscriminada e prolongada dos medicamentos antifúngicos tem contribuído também no desenvolvimento de casos de resistência (Bicanic et al. 2006).

Alterações no ERG3 ou ERG6 estão envolvidas na resistência a AmB, pois este gene possui função na biossíntese do ergosterol e sua expressão está relacionada ao acúmulo de outros esteróis na membrana fúngicas. Os isolados de *Cryptococcus* resistentes a este polieno têm um teor de ergosterol relativamente baixo, em comparação com os isolados susceptíveis (Dick et al. 1980; Pemán et al. 2009; Vandeputte et al. 2012; Segundo Kelly et al. 1994). A resistência de AmB pode ocorrer também devido a mutação do gene *ERG2*, que leva a algumas alterações na enzima esterol isomerase, que está envolvida no processo da biossíntese de esteróis.

A interferência no sistema de transporte do fármaco, pode proporcionar resistência múltipla aos fármacos (MDR), podendo haver envolvimento com a superfamília ABC

transportadora (proteínas de membrana), codificada pelo gene CDR, influenciando no mecanismo de resistência (Perea & Patterson 2002). A alta concentração intracelular de azóis, que ao interagir com as moléculas enzimáticas, induz a substituição de aminoácidos da composição das enzimas, alterando sua função. Isto resulta em prejuízo do mecanismo de efluxo do fármaco, propiciando a diminuição da afinidade aos derivados azólicos (Perea & Patterson 2002).

Neste cenário torna importante a busca de alternativas para o sucesso na terapia da criptococose, e as plantas se apresentam como grande potencial.

## REFERÊNCIAS

Adukwu EC, Bowles M, Edwards-Jones V, Bone H. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 9619–9627, 2016.

Akhila A. Biosynthetic relationship of citral-trans and citral-cis in *cymbopogon flexuosus* (lemongrass). *Phytochemistry*. 24: 2585–2587, 1985.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49: 4168–4170, 2001.

Almeida F, Wolf J M, Casadevall A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 14: 1173–1185, 2015.

Almeida, L. Atividade Antifúngica e Alterações Morfológicas Induzidas pelo Óleo Essencial de *Cinnamomum cassia* frente Cepas de *Candida albicans* Isoladas de Pacientes HIV Positivos. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 12: 393–398, 2012.

Araujo GS, Fonseca FL, Pontes B, Torres A, Cordeiro RJB, Zancopé-Oliveira RM, Casadevall A, Viana NB, Nimrichter L, Rodrigues ML, Garcia ES, Souza W, Frases S. Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. *PLoS ONE*. 7: 29561, 2012.

Assal FE, Paula MAJ, Capeletti LS, Abrão FY, Ataídes FS, Sá FAS, Costa CR, Silva MRR. Pimenta pseudocaryophyllus inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47: 618–623, 2014.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446–475, 2008.

Bowman PI, Ahearn DG. Evaluation of commercial systems for the identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 1: 49–5, 1976.

Brajtburg J, Bolard J. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. *American Society for Microbiology*. 9: 512–531, 1996.

Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 62: 1507–1512, 1994

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press. Washington, D.C, 1998

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44: 139, 1999.

CLSI. CLSI M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clin. Lab. Stand. Institute, Wayne, 2008.

CLSI. CLSI M27-S4: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, 2012.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada, Segunda Edição. 2002.

Coenjaerts F. The sixth international conference on Cryptococcus and cryptococcosis. *FEMS Yeast Research*. 6: 312–317, 2006.

Crockett, C.O; Guede-Guina, F.; Pugh D; Vangah-Manda M; Robinson J ; Qlubadewo J.O; Ochillo. Cassia alata and the pre-clinical search for therapeutic agents for the treatment of opportunistic infections in AIDS patients. *Cell Mol, Biol*, 35: 505-511. 1992.

Davey KG, Johnson EM, Holmes AD, Szekely A, Warnock DW. In-vitro susceptibility of Cryptococcus neoformans isolates to fluconazole and itraconazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 42: 217–20 , 1998.

Doering TL. How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in Cryptococcus neoformans. *Annual Review of Microbiology*. 63: 223–247, 2009

Durski KN, Kuntz KM, Yasukawa K, Virnig BA, Meya DB, Boulware DR. Cost-Effective Diagnostic Checklists for Meningitis in Resource-Limited Settings. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 63: 1077-9450, 2013.

Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber BW, Emerson RJ, Camesano TA, Casadeval A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. *Biochemistry*. 44: 3683–3693, 2005.

Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 7–10, 2002.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of Cryptococcus neoformans var. gattii. *Journal of clinical microbiology*. 28: 1642–4, 1990.

Ganendren R, Carter E, Sorrel T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of Cryptococcus neoformans a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*. 8: 1006, 2006.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Pammen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 78: 16–48, 2015.

Hoeprich PD. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. *Clin Infect Dis*. 14: 114-119, 1992.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 1027–1031, 2002.

Janbon G, Himmelreich U, Moyrand F, Improvis L, Dromer F. Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide. *Molecular Microbiology*. 42: 453–467, 2001.

Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. 2119–2129 , 2007.

- Junior AMB, Santos BFO, carvalho EO, Melo DLFM, Trindade RC, Stoianoff MAR. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. *J Bras Patol Med Lab.* 49; 160–168, 2013.
- Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 29: 227–231, 1997.
- Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia.* 68: 943–6, 1976.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology.* 120:123-130, 1984
- Logu A. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 55: 692–698, 2005.
- Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity,* 62: 5154–5156, 1994.
- Mansour MK, Vyas JM, Levitz SM. Dynamic Virulence: Real-Time Assessment of Intracellular Pathogenesis Links *Cryptococcus neoformans* Phenotype with Clinical Outcome. *MBio,* 2: e00217-e00217, 2011.
- Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumo.* 32: 449–60, 2006.
- Martinez LR, Casadevall A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infection and Immunity.* 73: 6350–6362, 2005.
- Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Applied and Environmental Microbiology,* 73: 4592–4601, 2007.
- Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 50: 1021–33, 2006.
- Mcfadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology,* 14: 497–505, 2006.
- Medagama AB, Bandara R. The use of Complementary and Alternative Medicines (CAMs) in the treatment of diabetes mellitus: is continued use safe and effective. *Nutrition Journal,* 13: 102, 2014.
- Medagama AB. The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials. *Nutrition Journal,* 14: 108, 2015.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffleti D, Perfect J; Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO journal,* 16: 2576–2589, 1997.
- Park, Benjamin J, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids.* 23: 525–530, 2009.
- Passos, XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFLF, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop.*35: 623–627, 2002.



Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40: 566–568, 2007.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 50: 291–322, 2010.

Perfect JR. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 124; 1–5, 2014.

Riceto EBM, Menezes RP, Penatti MPA, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*. 32: 79–82, 2011

Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*. 6: 48–59, 2007.

Staib F. Das Verhalten von *Candida albicans*- und *Cryptococcus neoformans*-Stämmen gegenüber human-serum-proteinen. *Mycopathol Mycol Appl*, 26: 209-24, 1965

Tefsen B, Grijpstra J, Ordonez S, Lammers M, van Die I, de Cock H.. Deletion of the CAP10 gene of *Cryptococcus neoformans* results in a pleiotropic phenotype with changes in expression of virulence factors. *Research in Microbiology*. 165: 399–410, 2014.

Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, Rude TH, Toffaletti DT, John R. Perfect JR, Kurtz M. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *Journal of Bacteriology*. 181: 444–53, 1999.

Urán ME, Cano E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Infectio*, 12: 128–148, 2008.

Wickenberg J, Lindstedt S, Nilsson J, Hlebowicz J. Cassia cinnamon does not change the insulin sensitivity or the liver enzymes in subjects with impaired glucose tolerance. *Nutrition journal*. 13: 96, 2014.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009.

# CAPÍTULO 5

## *Corynebacterium pseudotuberculosis* PROTEIN EXTRACT INDUCES IP10 PRODUCTION IN BLOOD SAMPLES OF INDIVIDUALS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Data de aceite: 01/06/2020

Submission date: 05/03/2020

### **Rogério Reis Conceição**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/1968670876252647>

[rogerioreisconceicao@gmail.com](mailto:rogerioreisconceicao@gmail.com)

### **Samanta Queiroz dos Santos**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/9663458541454602>

### **Zunara Victória Santana Batista**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6616432566735398>

### **Ramon Mendes dos Santos**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/2239694896220013>

### **Silvânia Maria Andrade Cerqueira**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6382393685853768>

### **Caio Lopes Borges Andrade**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/3027186212966797>

### **Soraya Castro Trindade**

Universidade Estadual de Feira de Santana

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/4927186541075656>

### **Fúlvia Soares Campos de Sousa**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/0611165561750495>

### **Lilia Ferreira de Moura-Costa**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6672994596587713>

### **Marcos Borges Ribeiro**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/7634265862645053>

### **Roberto Meyer**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/9574426480028427>

### **Songelí Menezes Freire**

Universidade Federal Bahia

Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/8634866589762862>

**ABSTRACT:** *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* are part

of the CMRN group and share similarities among some virulence/pathogenicity factors. The objective of the present study was to use semi-purified extracts of *C. pseudotuberculosis* strains to evaluate antigenicity in samples of individuals diagnosed with active pulmonary tuberculosis. Voluntary participants with positive tuberculosis (TB) diagnosis and treatment-naïve tuberculosis (n=28), without complaints, no history or symptomatology of TB or *M. tuberculosis* infection (n=28). With heparinized blood, cell stimulation was carried out using mitogen (PWM) and *C. pseudotuberculosis* protein extract (PAT-10, VD57 and FRC-41 strains). For cytokines measurement, BD Cytometric Bead Array (CBA) was used. Semi-purified extracts of all three *C. pseudotuberculosis* strains induced production of cytokines in blood samples from studied groups. In addition, they differentiated studied groups when compared to IFN- $\gamma$  and IP-10. *C. pseudotuberculosis* strains extracts PAT10, VD57 and FRC41 induced production of IFN- $\gamma$ , IP-10 in blood samples from individuals infected with *M. tuberculosis*. Under stimuli of extracts used, the detection of IFN- $\gamma$  and IP-10 differentiated the control group and active TB groups.

**KEYWORDS:** *Corynebacterium Pseudotuberculosis*; Cytokines; *Mycobacterium Tuberculosis*; Tuberculosis; Antigenicity

## 1 | INTRODUCTION

Several scientific researches are carried out to identify and obtain reagents that make up laboratory diagnostic kits, and for that, molecules (antigens) of the infectious agents are necessary for evaluation of the host response with *in vivo* or *in vitro* models. Some biomolecules can be shared by different biological agents, such as *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which can be used in cross-reactive studies, to evaluate immune response and diagnostic tests <sup>[1]</sup> and it's cost benefit. The diagnosis of *M. tuberculosis* infection should be made clinically and by screening methods. When suggestive, it should be confirmed by laboratory methods, with agent identification, such as in sputum microscopy and molecular tests <sup>[2]</sup>. In a country with a high incidence rate, such as Brazil, despite the current technological resources used to control tuberculosis, it could be considered necessary to seek innovative strategies regarding diagnostic methods and immunoprophylaxis, aimed at the early diagnosis of TB cases, and its effective treatment, since rapid and safe diagnosis, accompanied by early treatment, are fundamental measures to break the transmission chain and control tuberculosis <sup>[3]</sup>. On the other hand, the infection by *C. pseudotuberculosis* that compromises superficial and deep lymph nodes has a course of infection that may involve respiratory organs in goats and sheep presents an infectious model similar to that of human tuberculosis <sup>[4]</sup>. Additionally, due to the continuously discussed similarities between some virulence / pathogenicity factors of these bacterias, the objective of this study was to use semi-purified extracts of *C. pseudotuberculosis* strains to investigate their *in vitro* antigenic

capacity, in the cellular immune response by cytokines release as a model proposed with samples from individuals with active pulmonary tuberculosis.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Ethical aspects and Selection of Study Participants

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Institute of Health Sciences - CEP-ICS / UFBA (CAAE nº 57662016.8.1001.5662). The study population consisted of 56 volunteers from the Bahia lung disease specialized Hospital and a clinical laboratory in a public University of Bahia through march-june 2017 categorized into two groups. Group 1 (control, n = 28): Individuals without complaints, history or symptoms of pulmonary TB and without M. tuberculosis infection (negative Tuberculin Skin Test / non-reactive TST) and with normal white blood cell count (WBC). Group 2 (active pulmonary TB, n = 28): Individuals with TB diagnosis, as recommended by the Ministry of Health protocols performed at the service unit, (Positive Molecular Rapid Test (GeneXpert®) without resistance to rifampicin, positive smear microscopy and / or culture of BK positive) and with normal WBC. Samples from this group were collected before beginning treatment. Samples of participants who reported contact or consumption of derivatives (meat and / or raw milk) of small ruminants were not included in the analysis avoiding research vies by cross reaction.

### 2.2 Production of extracts of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Three strains of *C. pseudotuberculosis* were used: strain PAT10, of a pulmonary abscess in a sheep from Argentina Patagonia <sup>[5]</sup>, strain VD57 isolated from a granulomatous lesion in a goat of the municipality of Juazeiro, State of Bahia <sup>[6]</sup> and strain FRC41, isolated from the inguinal lymph node of a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis in France <sup>[7]</sup>. The cultures in Brain Heart Infusion (BHI), the three-phasepartitioning (TPP) technique was performed, according to <sup>[8]</sup>, with minor modifications. Protein dosage was performed using Bio-Rad Protein Assay (Lowry).

### 2.3 Blood collection

Samples of blood were obtained into heparinized tube to perform the *in vitro* cell stimuli and in EDTA tube for WBC Counting.

### 2.4 *In vitro* stimulation with *Corynebacterium pseudotuberculosis*

In a sterile 24-well plate for cell culture, 0.5 ml of blood per well was added to each extract at a protein concentration of 25ug / ml, as established in previous standardization.

The pokeweed (PWM) was employed at a concentration of 5ug / ml as a positive control. Pure blood and stimulus samples were incubated at 37°C for 24 hours. The supernatants obtained by centrifugation were immediately stored at -20°C for subsequent cytokine dosing.

## 2.5 Dosing of cytokines

The cytokines IFN- $\gamma$  dosage were performed by the Human Th1 / Th2 / Th17 Cytokine Kit (BD®) and IP-10 was dosed by the Human IP-10 CBA Flex Set Kit (BD®), both following the manufacturer's recommendations. Acquisition was predetermined for 3,000 events in FACSCalibur-BD, with Cell Quest Pro Software (BD®). Analysis were done in the FCAP Array™ software.

## 2.6 Statistical analysis

For the data normality analysis, the Kolmogorov-Smirnov test was used. T-test was used to analyze cytokine data with parametric (normal) distribution and Mann-Whitney test for nonparametric (abnormal) distribution. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Data obtained in the study were analyzed in GraphPadPrism v 5.0 software.

## 3 | RESULTS

Epidemiological characteristics of the studied population are described in table 1. It is observed that female participants are in a higher proportion than the male participants in the control group, unlike the TB group in which there is an equivalent proportion of both sexes.

	Variable	Control (N=28)	TB (N=28)
<b>Sex</b>	Female	20 (71,5%)	14 (50,0%)
	Male	8 (28,5%)	14 (50,0%)
<b>Age</b>	Mean (Interval)	35 (20 – 63)	36 (19 – 55)
<b>Observation of BCG scar</b>	Yes	24	22
	No	4	6
<b>TB contact</b>	Domicile	3	7
	Work	4	8
	Other	1	5
	No Contact	20	8

Table 1 - Clinical-epidemiological characteristics of the study population.

Figures 1 and 2 show the median concentrations of IFN- $\gamma$  and IP-10 cytokines in the whole blood samples after in vitro stimulation in the two study groups.

In the control group, the median concentrations of IFN- $\gamma$  without stimulus (S / EST), basal condition, were zero and the value of minimum and maximum of 0.0 - 20.61. There

was statistical significance in the intragroup comparison with the stimuli PAT10, VD57, FRC41 ( $p < 0.0001$ ). In the TB group, the median IFN- $\gamma$  S / EST concentrations were 4.18 pg / mL and the minimum and maximum values of 0.0-31.88, in the intragroup comparison, significance was obtained in the stimuli VD57 ( $p = 0.0114$ ) and FRC41 ( $p = 0.0062$ ). In both groups the medians of the cytokine dosed under all stimuli were larger than the basal. In the intergroup analysis there was significance between S / EST ( $p = 0.0045$ ), PAT10 ( $p = 0.0050$ ) and VD57 ( $p = 0.0007$ ). There is a lower concentration of IFN- $\gamma$  dosed in the different stimuli of the TB group, in relation to the control group, except in basal condition (Figure 1).

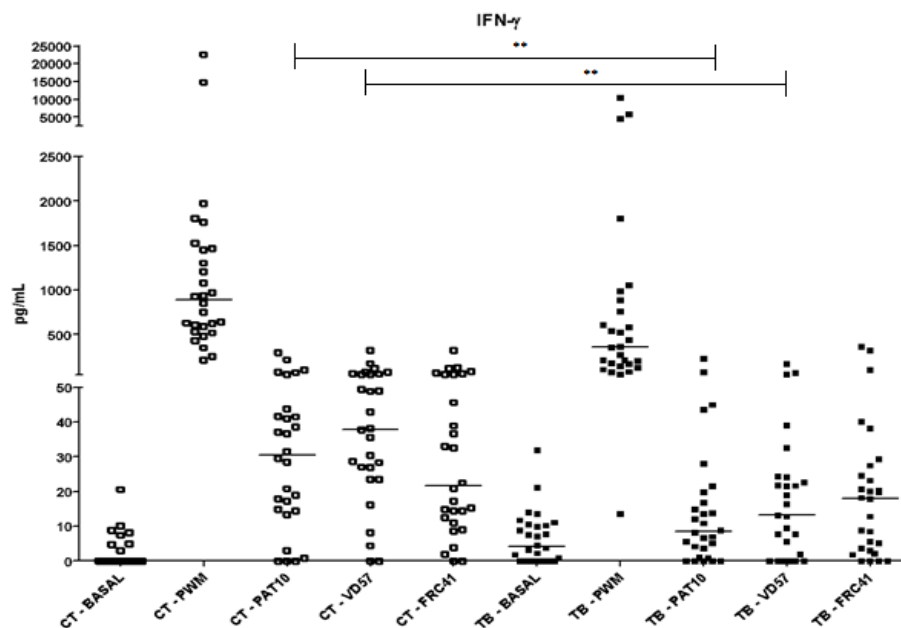


Figure 1 - IFN- $\gamma$  in peripheral blood stimulated in vitro for 24 hours with extracts antigen secreted by *C. pseudotuberculosis* strains. The median value is expressed in the horizontal line. Being: Control / CT ( $n = 28$ ) and Tuberculosis / TB ( $n = 28$ ). PWNM: pokeweed; PAT10, VD57, FRC41: extracts of the strains PAT10, VD57 and FRC41 of *C. pseudotuberculosis*, respectively. Pre-determined acquisition of 3000 events with the Cytokine-BD Human Th1 / Th2 / Th17 Kit using Cell Quest Pro-BD® Software. Analysis software: FCAP Array BD®. Statistical analysis: In-group: Basal X CT-PAT10, CT-VD57, CT-FRC41 (all  $p < 0.0001$ ), BASAL X TB-VD57 ( $p = 0.0114$ ), X TB-FRC41).

The median concentrations and the minimum and maximum values of IP-10 in the control group were 252.2pg / mL and 26.11 - 2806, respectively. The median IP-10 concentrations of basal blood in the control group were lower than the median values under stimulus, PAT10, VD57, FRC41 ( $p < 0.0001$ ). In the TB group, basal median was 877.9pg / mL and minimum and maximum values were 101.6 - 7799. IP-10 concentrations were higher under stimulation with PAT10 ( $p = 0.0044$ ), VD57 ( $p < 0.0001$ ) and FRC41 ( $p = 0.0032$ ) than from basal. The IP-10 concentrations of the TB group were higher in relation to the control group. There is a difference of the IP-10 dosed between the CTxTB groups in the conditions BASAL ( $p < 0.0001$ ), PAT10 ( $p = 0.0470$ ) and FRC41 ( $p = 0.0044$ ) (Figure 2)

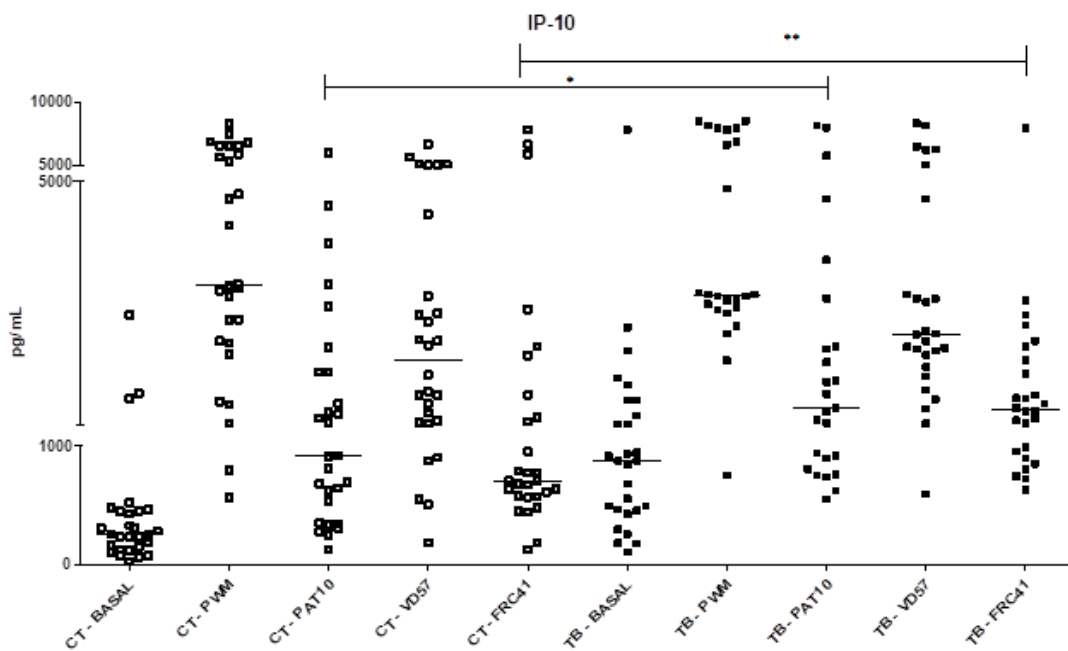


Figure 2 -IP-10 in peripheral blood stimulated for 24 hours with antigenic extract secreted by *C. pseudotuberculosis* strains. The median value is expressed in the horizontal line. Being: Control / CT (n = 28) and Tuberculosis / TB (n = 28). PWM: pokeweed; PAT10, VD57, FRC41: extracts of the strains PAT10, VD57 and FRC41 of *C. pseudotuberculosis*, respectively. Pre-determined acquisition of 3000 events with the BD™ CBA Human IP-10 Flex kit using Cell Quest Pro-BD® software. Analysis software: FCAP Array BD®. CT-PAT10, CT-VD57, CT-FRC41 (p <0.0001); TB-VD57 (p <0.0001) TB-FRC41 (p = 0.0032). The continued bar presents statistical analysis of the difference between groups (CTxTB).

#### 4 | DISCUSSION

The profile of the effective immune response against *M. tuberculosis* is Th1, IFN- $\gamma$  is the main cytokine involved in this context, but the action of the cytokine alone is not sufficient to promote protection against this bacillus, and thus the contribution of components cell and other cytokines are required to promote effective protection, such as TNF, IL-2 and IL-6 [9]; [10]. Chemokines such as IP-10 also aid the Th1 response profile. On the other hand, the development of Th2 profile involves IL-4 and other cytokines, which act to inhibit the Th1 response against *M. tuberculosis*. IL-10 exerts functions similar to IL-4 [9]; [11]. The antigenic potential of the *C. pseudotuberculosis* semi-purified extracts from strains PAT10, VD57 and FRC41 was demonstrated by the measurement of higher concentrations of cytokines IFN- $\gamma$ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6, IL-10 and IL-17, after stimulation in the study subjects, with the exception of IL-4 in the control group. Increased production of these cytokines when stimulated with *M. tuberculosis* specific antigens was observed in the works of [12] and [13]. Rebouças et al (2011) [14], using *C. pseudotuberculosis* semi-purified antigens in samples of small ruminants with caseous lymphadenitis, showed higher levels of IFN- $\gamma$  in the group of infected animals after stimulation. PAT10 extract was able to differentiate study groups when IFN- $\gamma$  concentrations were compared. Although it is found in small amounts, IFN- $\gamma$  is currently used as a biomarker for TB [15].

Under antigenic stimuli, lower IFN- $\gamma$  levels were measured in the TB group (Table 1) compared to the control group. This may have occurred because of the short incubation time, already in the presence of mycobacterial antigens, IFN- $\gamma$  remained at undetectable concentrations before the sixth day of stimulation<sup>[16]</sup>. In addition, IFN- $\gamma$  production in response to a specific *M. tuberculosis* antigen appears to decrease in untreated TB individuals<sup>[17]</sup> which may have occurred in the present study.

Evaluating the cytokine profile in peripheral blood of patients with active TB and healthy contacts, in response to the *M. tuberculosis* 30-Kd antigen, Torres et al. (1998)<sup>[18]</sup> found lower concentrations of IFN- $\gamma$  in the TB group. The authors have suggested that IFN- $\gamma$  plays a protective role in healthy contact individuals. Deenadayalan et al (2010)<sup>[19]</sup> demonstrated the same results as in this present study.

Similarly to the IFN- $\gamma$  concentrations, IP-10 concentrations were able to differentiate the study groups, however with higher concentrations in the TB group. Thus, IP-10 may be a useful biomarker to monitor the efficacy of therapy in patients with active TB<sup>[20]</sup>, since this molecule exists in a larger amount of serum which would facilitate its laboratory dosage and clinical interpretation<sup>[21]; [22]</sup>. Several studies have shown high production of IP-10 in individuals infected with *M. tuberculosis*, allowing the development of updated and simplified test platforms<sup>[15]</sup>.

The VD57 antigen was able to differentiate study groups when compared to the concentrations of IFN- $\gamma$ . The FRC41 antigen, following the previous comparison, led to the differential production of IP-10 between the groups. The VD57 antigen stimulation allowed the differentiation of the groups when evaluating the concentrations of IFN- $\gamma$ . The culture with FRC41 antigen culminated in the differential production of IP-10 between the groups.

These extracts have potential for use in an immunodiagnostic kit, although they require complementary studies in order to identify which components of the protein extracts interact with the immune system stimulating the production of the cytokines.

#### 4.1 Acknowledgment

Laboratory of immunology and molecular biology of UFBA and CAPES.

## 5 | CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. DORELLA, F. A. et al. **Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development.** Expert Reviews in Vaccine, 8(2):205-213, 2009.
2. FERRI A. O., et al. **Diagnóstico da tuberculose: uma revisão.** Revista Liberato. 15(24): 105 – 212, 2014.



3. PEREIRA, A. A. et al. **Gestão e gerenciamento dos níveis hierárquicos do programa nacional de controle da tuberculose.** IJHE-Interdisciplinary Journal of Health Education, v. 1, n. 1, 2016.
4. DORELLA, F. A. et al. **Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.** Veterinary research, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
5. CERDEIRA, L. T. et al. **Whole-genome sequence of Corynebacterium pseudotuberculosis PAT10 strain isolated from sheep in Patagonia, Argentina.** Journal of bacteriology, v. 193, n. 22, p. 6420-6421, 2011.
6. ALMEIDA, S. et al. **The genome anatomy of Corynebacterium pseudotuberculosis VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis.** Standards in genomicsciences, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.
7. TROST, E. et al. **The complete genome sequence of Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence.** BMC genomics, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.
8. PAULE, B. J. A. et al. **Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of Corynebacterium pseudotuberculosis.** Protein expression and purification, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2004.
9. VAN CREVEL, R; OTTENHOFF, T. H. M; VAN DER MEER, J. W. M. **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.** Clinical microbiology reviews, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.
10. KHANNA, M; SRIVASTAVA, L. M; KUMAR, P. **Defective interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in pulmonary tuberculosis.** The Journal of communicable diseases, v. 35, n. 2, p. 65-70, 2003.
11. ROOK, W.; GRAHAM, A. **Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis.** Current molecular medicine, v. 7, n. 3, p. 327-337, 2007.
12. KELLAR, K. L. et al. **Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis antigens.** PLoS One, v. 6, n. 11, p. e26545, 2011.
13. YOU, E. et al. **Evaluation of IL-2, IL-10, IL-17 and IP-10 as potent discriminative markers for active tuberculosis among pulmonary tuberculosis suspects.** Tuberculosis, v. 99, p. 100-108, 2016.
14. REBOUÇAS, M. F. et al. **Corynebacterium pseudotuberculosis secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats.** Journal of veterinary diagnostic investigation, v. 23, n. 2, p. 213-220, 2011.
15. AL-ATTIYAH, R.; EL-SHAZLY, A.; MUSTAFA, A. S. **Comparative Analysis of Spontaneous and Mycobacterial Antigen Induced Secretion of Th1, Th2 and Pro Inflammatory Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Tuberculosis Patients.** Scandinavian journal of immunology, v. 75, n. 6, p. 623-632, 2012.
16. RUHWALD, M.; RAVN, P. **Biomarkers of latent TB infection.** Expert review of respiratory medicine, v. 3, n. 4, p. 387-401, 2009.
17. SAHIRATMADJA, E. et al. **Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment.** Infection and immunity, v. 75, n. 2, p. 820-829, 2007.
18. TORRES, M. et al. **Cytokine Profiles for Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Healthy Household Contacts in Response to the 30-Kilodalton Antigen of Mycobacterium tuberculosis.** Infection and immunity, v. 66, n. 1, p. 176-180, 1998.

19. Deenadayalan et al (2010)

20. HONG, J. Y. et al. **Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment.** Journal of Infection, v. 68, n. 3, p. 252-258, 2014.

22. RUHWALD, M. et al. **CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7. 7.** Microbes and infection, v. 9, n. 7, p. 806-812, 2007.

22. WON, E. et al. **Biomarkers for discrimination between latent tuberculosis infection and active tuberculosis disease.** Journal of Infection, v. 74, n. 3, p. 28

## EFFECTS OF SUB-INHIBITORY CONCENTRATION OF ANTIMICROBIALS IN *Bacteroides fragilis* STRAINS ISOLATED FROM INTRA-ABDOMINAL INFECTIONS

Data de aceite: 01/06/2020

Submission date: 24/04/2020

### **Marcela Abreu Menezes**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/8062313295602870>

### **Priscila Simão Costa**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/9397402066174149>

### **João Paulo Amaral Haddad**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/3673445041898307>

### **Cristina Dutra Vieira**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/0359154255310049>

### **Luiz de Macêdo Farias**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/3041207015099007>  
e-mail: macedo@ufmg.br

### **Simone Gonçalves dos Santos**

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Microbiologia  
Belo Horizonte, Minas Gerais.  
<http://lattes.cnpq.br/2078192817381979>  
e-mail: simonesantososkey@ufmg.br

**ABSTRACT:** *Bacteroides fragilis* is the obligate anaerobe most frequently associated with infectious diseases in humans. Sub-minimal inhibitory concentrations (Sub-MICs) of different antimicrobials are potentially capable of interfering positively or negatively with microbial pathogenicity. Thus, the effects of sub-MIC of Piperacillin+tazobactam (PTZ), Metronidazole (MET) and Clindamycin (CLI) on strains of *B. fragilis* strains were evaluated in this study. One reference and two clinical strains were previously cultured in sub-MIC of these three antimicrobials to investigate alterations in cell morphology, grown curve, capsule production, resistance to hydrogen peroxide, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, hemagglutination ability, and hemolytic activity. Sub-MICs of both MET and CLI led to significant delays in the log growth phase of the all strains. Sub-MICs of both PTZ and MET caused changes in cell morphology. Overall, sub-MIC of the three antimicrobials

decreased resistance to the hydrogen peroxide in all strains. All strains showed haemolysis in all blood types tested, except for one clinical strain cultured with sub-MICs of the three antimicrobials in sheep's blood. Therefore, sub-MICs of antimicrobials suggest being able to alter bacterial physiological patterns, which reflect on their pathogenicity and may affect the diagnosis and treatment of infectious diseases caused by *B. fragilis*.

**KEYWORDS:** *Bacteroides fragilis*, pathogenicity, antimicrobial subinhibitory concentrations.

## EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Bacteroides Fragilis* ISOLADAS DE INFECÇÕES INTRA-ABDOMINAIS

**RESUMO:** A espécie *Bacteroides fragilis* é um anaeróbio obrigatório frequentemente associado a doenças infecciosas em humanos. Concentrações sub-inibitórias mínimas (Sub-CIMs) de diferentes antimicrobianos podem interferir positiva ou negativamente em sua patogenicidade. Assim, os efeitos da sub-CIM de Piperacilina + tazobactam (PTZ), Metronidazol (MET) e Clindamicina (CLI) nas linhagens de *B. fragilis* foram avaliados neste estudo. Uma amostra de referência e clínicas foram previamente cultivadas em sub-CIM desses três antimicrobianos, para investigar alterações na morfologia celular e na curva de crescimento; produção de cápsulas, resistência ao peróxido de hidrogênio; formação de biofilme; hidrofobicidade da superfície celular; capacidade de hemaglutinação; e atividade hemolítica. Sub-CIM de MET e CLI acarretaram atrasos significativos na fase log de crescimento de todas as amostras testadas. As sub-MICs de PTZ e MET causaram alterações na morfologia celular. No geral, as sub-MICs dos três antimicrobianos diminuíram a resistência das amostras ao peróxido de hidrogênio. Todas as bactérias testadas apresentaram hemólise em todos os grupos sanguíneos, exceto uma amostra clínica, cultivada em sub-CIM dos três antimicrobianos, testada com sangue de ovelha. As alterações na patogenicidade apontam para prováveis riscos de uma terapia antimicrobiana inadequada, podendo induzir diferentes interações entre o hospedeiro e a bactéria, além de afetar o diagnóstico e o tratamento de doenças infecciosas causadas por *B. fragilis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacteroides fragilis*, patogenicidade, concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos.

## 1 | INTRODUCTION

The genus *Bacteroides* is composed of pleomorphic obligate anaerobes, Gram-negative rods and *B. fragilis* is the most prominent species found in human infections disease (LIU *et al.*, 2003). Several virulence abilities contribute to the survival and success of this species in infectious processes, such as capsule production (NAKANO *et al.*, 2008). The presence of fimbriae is associated with adhesion and hemagglutination ability (CHANDAD & MOUTON, 1995). *B. fragilis* can also, produce hemolysins whose main functions are the destruction of erythrocytes and leukocytes (ROBERTSON *et al.*, 2006;

LOBO *et al.*, 2013;) and to form biofilms, important to the host's immune response and antimicrobial agents (REIS *et al.*, 2014). *B. fragilis* uses efflux pumps to expel harmful agents including antimicrobials (DONELLI *et al.*, 2012). It is also able to withstand the reactive oxygen species produced by the host's defenses and persists in oxygenated tissues (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Species of the genus *Bacteroides* are generally isolated from mixed infectious diseases, such as intra-abdominal infections (IAIs), usually in combination with aerobic or facultative bacteria. The most commonly prescribed antimicrobials for IAIs caused by *Bacteroides* species include beta-lactams (which may be combined with a beta-lactamase inhibitor), carbapenems, metronidazole (MET) and clindamycin (CLI) (DOS SANTOS *et al.*, 2004).

To achieve satisfactory levels of antimicrobials in abscesses with low perfusion or necrotic tissues, larger doses are recommended for extended periods of time. Poor management of this parameter may result in lower levels of antimicrobial efficacy and consequently reaching sub-minimal concentrations (sub-MICs) at the site of infection. This may lead to failure in eliminating the bacterial pathogens. Moreover, bacteria exposed to sub-MIC have several aspects of microbial physiology altered, including changes in cell surface hydrophobicity and biofilm formation (VELOSO *et al.*, 2013; DE ANDRADE *et al.*, 2016; CLSI, 2017).

In this regard, the effect of sub-MICs on the physiology of *B. fragilis* during infection is still not completely understood. Thus, the aim of this study is to evaluate the effects of sub-MICs of piperacillin + tazobactam (PTZ), metronidazole (MET) and CLI on the physiology of *B. fragilis* which seem to be involved in its pathogenicity traits, such as cell morphology, capsule presence, resistance to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), biofilm formation, cell surface hydrophobicity, haemagglutination, and hemolytic activity. We also evaluated the presence of the genes for hemolysins A, B, C, E and III by conventional polymerase chain reaction (PCR).

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Bacterial strains

One reference strain (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285) and two clinically isolated from patients with IAIs were evaluated (named P34 and P50). The clinical strains were isolated, identified and had their susceptibility profile established in a previous study (FERREIRA *et al.*, 2016) approved by the Research Ethics Committee of Minas Gerais University, under the number ETIC 0097.0.203.000-10. *B. fragilis* identification was performed by the automated system Vitek II (Biomérieux®) and by PCR amplification with 16S rRNA primers, according to Liu *et al.* (2003).

## 2.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of PTZ, MET and CLI for the *B. fragilis* strains studied

The followed antimicrobials were used: *piperacillin/tazobactam* (Aurobindo Pharma, Andhra Pradesh, India), *MET* and *CLI* (Sigma-Aldrich São Paulo, Brazil). The criteria used for antimicrobial selection occurred according to the proposition of the Infectious Disease Society of America – IDSA (SOLOMKIN *et al.*, 2010). The MIC pattern was determined by the broth dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2017).

The MIC was considered the antimicrobial concentration at which no visible growth of the strains was detected, and the obtained results were interpreted according to the CLSI (2017), while the *sub-inhibitory concentrations* corresponded to 1/2 of the MIC of the antimicrobials (PTZ, MET and CLI). This test was repeated three times to confirm the result. For quality control of the tests, the reference strain *B. fragilis* ATCC 25285 and *Eggerthella lenta* ATCC 43055 were included in all experiments.

## 2.3 Growth curves of *B. fragilis* strains without and with sub-inhibitory concentrations of PTZ, MET or CLI

To determine the time at which the cultures would reach between the intermediate log and the beginning of the stationary phase (required for all experiments), growth curves of *B. fragilis* were constructed in the absence or presence of 1/2 MIC of the antimicrobials.

Pre-inoculum of each bacteria grown in BRU-S under anaerobic conditions at 37°C for 24 h were diluted in 90 mL of the same medium with and without sub-MICs of each antimicrobial (PTZ, MET and CLI), to an optical density (OD) of 0.1 at 550 nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, Vantaa, Finland). The flasks were then incubated in anaerobic chamber at 37°C and 100 µL aliquots of each bacterial culture were removed in triplicate to read the OD at 550 nm every 3 h up to 72 h (DOS SANTOS *et al.*, 2007; VELOSO *et al.*, 2013; DE ANDRADE *et al.*, 2016). For quality control of the tests the reference strain *B. fragilis* ATCC 25285 and *Eggerthella lenta* ATCC 43055 were included in all experiments.

## 2.4 Phenotypic tests to evaluate the pathogenicity of *B. fragilis* strains cultured previously in sub-MICs of PTZ, MET or CLI

*Cell morphology* - Bacteria were cultured on BRU-S, in the presence or absence of each antimicrobial at sub-MICs and incubated in an anaerobic chamber at 37°C for different times (determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). Then, a smear was made from the colonies grown, and Gram staining was performed for morphotintorial evaluation under optical microscopy with immersion objective (1000x magnification) (FREITAS *et al.*, 2015). The reference strain *B. fragilis* ATCC 25285 was used as quality control.

*Capsule Detection* – The Hiss staining method was used with modifications (NAKANO *et al.*, 2004). *B. fragilis* strains were cultured anaerobically in yeast extract and peptone with 1% glucose in the presence or absence of antimicrobials in sub-MICs and incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). One drop of this bacterial suspension was deposited on a microscopic slide. Then this was covered with crystal violet for 5 minutes. Each slide was washed with 20% copper sulfate and allowed to air dry. The capsule was visualized by optical microscopy with immersion objective (1000X magnification) by means of the verification of a free area around the bacteria.

*Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* - This test was performed using disk diffusion assays (DE ANDRADE *et al.*, 2016). The strains were cultured on BRU-S, in the presence or absence of antimicrobials in sub-MICs and incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 hours). Thereafter, a bacterial suspension at  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL was inoculated into BRU-S plates. Test carried out with the strains grown in the medium with sub-MICs of each antimicrobial and inoculated in Brucella agar without the drugs, was called 1X. On the other hand, when the strains were grown and plated in the agar medium with the respective antimicrobials in sub-MICs, it was called 2X. Sterile filter paper discs of 6 mm were placed on the plate added with 5  $\mu$ L of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agent (Merck, Darmstadt, Germany) at concentrations of 1%, 5%, 10% and 20%. After overnight incubation in anaerobiosis at 37°C, the diameters of the growth of the zones of inhibition (ZI) were measured. The tests were performed in duplicate and repeated on three different occasions.

*Biofilm Formation* - The microplate adhesion method was used (DONELLI *et al.*, 2012). After growth in anaerobiosis on BRU-S at 37°C for 48 h, a bacterial suspension with turbidity of 0.5 on the McFarland scale in 0.85% sterile saline was prepared. A total of 20  $\mu$ L of this suspension was added to 180  $\mu$ L of BRU-S, with the presence or absence of pre-determined sub-MICs and packed in a flat bottom 96-well microplate, in quadruplicate. The microplates were incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). After the recommended incubation and washing steps with phosphate buffered saline (PBS), the remaining bacteria were stained with 300  $\mu$ L of crystal violet (NewProv, Pinhais, PR, Brazil) for 10 min at room temperature. The absolute ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) was then added to solubilize the crystal violet that stained the biofilm. The solution contained in each well was transferred to a new, dry and clean plate. The absorbance was quantified in the spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, Vantaa, Finland) at a wavelength of 550 nm (DOS SANTOS *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2016). The tests were performed in quadruplicate and repeated on three different occasions. As a negative control, only BRU-S was used. The interpretation of the test was obtained by dividing the OD of the strains (OD<sub>a</sub>) by the OD of the negative control (OD<sub>c</sub>). The strains were also classified according to the

OD<sub>c</sub> into the following groups: OD ≤ OD<sub>c</sub> = non-adherent; OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2xOD<sub>c</sub> = weakly adherent; 2xOD<sub>c</sub> < OD ≤ 4xOD<sub>c</sub> = moderately adherent; 4xOD<sub>c</sub> < OD = strongly adherent (DONELLI *et al.*, 2012).

*Cell surface hydrophobicity* - It was evaluated by the Microbial Adhesion to Solvents (MATS) method, according to Kos *et al.* (2003). The bacteria were cultured in BRU-S in the presence or absence of the antimicrobial agents in sub-MICs and incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (previously determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). Subsequently, they were washed twice with 1 mL of PBS and resuspended in 0.1 M KNO<sub>3</sub> solution (pH 6.2) to obtain the OD at 600 nm. Subsequently, 60 µL of xylene (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) was added to 360 µL of the bacterial suspension, which was adjusted to an OD of 0.100 (A0). After 10 min preincubation at room temperature, the two-phase system was vortexed for 2 min and then held for 50 min. After this period, the aqueous phase was removed and the OD at 600 nm was evaluated (A1). MATS were calculated as the percentage of xylene associated bacteria according to the formula: MATS = [1 - (A1 / A0)] x 100. The strains were classified as highly hydrophobic (MATS > 70%), moderately hydrophobic (MATS 50-70%) or slightly hydrophobic (MATS < 50%). The tests were performed in triplicate and repeated on two different occasions.

*Hemagglutination* – The bacterium was cultured in BRU-S in the presence or absence of antimicrobials in sub-MICs and incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (previously determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). Pellets were then collected, centrifuged (12,000 rpm/10,000 g, 5 min) and washed three times in PBS. The bacterial suspension was adjusted to a concentration of 1.5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL. In parallel, erythrocytes of adult volunteers (A+, B+, AB+ and O+), horse and sheep were washed three times (5,000 rpm/600 g, 4°C, 5 min) and finally resuspended in PBS. Haemagglutination was qualitatively tested by mixing 50 µL of bacterial suspension with 5 µL of erythrocyte suspension in a 96-well (U-shaped) microtiter plate. Two serial dilutions of the bacterial suspension, with a final volume of 50 µL/well, were performed. Subsequently, 50 µL of erythrocytes were added to each dilution and the plate was gently shaken and incubated first at 37°C for 1h, then at 4°C overnight. Hemagglutination titers were expressed by the reciprocal of the highest activity dilution showing bacterial agglutination (NAKANO & AVILA-CAMPOS, 2004; HRV *et al.*, 2016).

*Hemolytic activity* – It was investigated in trypticase soy agar (TSA, Becton Dickinson - BD, Sparks, USA) enriched with 0.1% hemin and menadione and 5% blood from horse, sheep or human volunteers (A+, B+, AB+ and O+). The strains were cultured on BRU-S, in the presence or absence of antimicrobials in sub-MICs and incubated in anaerobiosis at 37°C for different times (determined on the growth curve: 30, 48, 72 and 96 h). Plates were inoculated in duplicate using Steers replicator, with final inoculum of 10<sup>5</sup> CFU/spot, and then incubated in anaerobiosis at 37°C for 1 week. The hemolytic activity was identified by checking a clear zone around the bacterial growth. *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615



was used as a positive control (NAKANO & AVILA-CAMPOS, 2004; HRV *et al.*, 2016).

## 2.5 Statistical Analysis

For the descriptive statistics SPSS (version 19.0), Excel and Stata version 12.0 (STATA Corp., TX, USA) were used. Stata was also used to perform linear regression analysis in an attempt to compare the dependent variables (inhibition halo size [mm], biofilm formation and hydrophobicity) with the independent variables. Three bacterial strains submitted or not to sub-MICs of PTZ, MET or CLI and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%, 5%, 10% and 20%). Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 Minimum Concentrations of PTZ, MET and CLI capable of inhibiting the growth (MIC) of *B. fragilis* strains evaluated

The MIC of the three antimicrobials tested for the *B. fragilis* reference (ATCC 25285) and the two clinical strains (named P34 and P50) were determined according to CLSI (2017) guidelines. The sub-MIC was defined as  $\frac{1}{2}$  of the MIC, except for the P50 strain cultured in the presence of CLI, whose subinhibitory concentration was  $\frac{1}{4}$  of the MIC due to the technical impossibility to test this bacterial strain against the  $\frac{1}{2}$  of the CLI MIC (Table 1).

Strains	PTZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	MET ( $\mu\text{g/mL}$ )	CLI ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	1.0	1.0	0.5
<i>B. fragilis</i> P34	1.0	2.0	0.25
<i>B. fragilis</i> P50	1.0	4.0	1.024

Table 1: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Piperacillin/Tazobactam, Metronidazole and Clindamycin for *B. fragilis* strains described in this study.

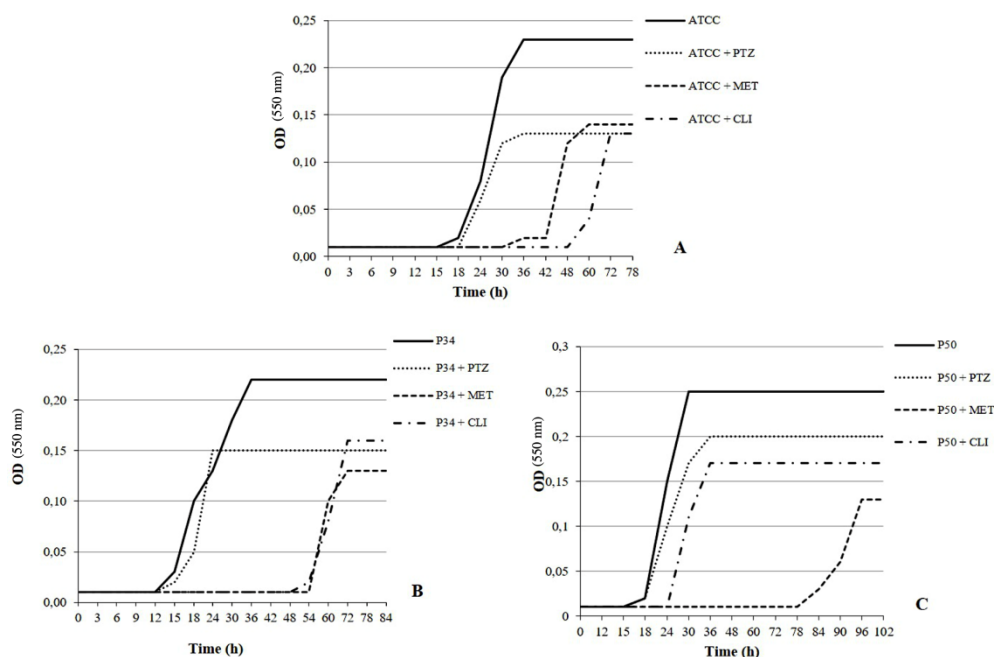
Legend: PTZ: Piperacillin/Tazobactam; MET: Metronidazole; CLI: Clindamycin.

### 3.2 Growth curves of *B. fragilis* strains cultured with sub-MICs of PTZ, MET or CLI

When the growth curves were compared for the transition from mid-log to stationary phase between the strains, it was observed that it took 30 h after inoculation for the reference strain (ATCC), P34 and P50 grown without antibiotics to attain this stage. The same strains cultured with PTZ (ATCC+PTZ, P34+PTZ) and the P50 strain cultured with CLI (P50+CLI) also attained that state after 30 h. The P34 strain cultured with CLI (P34+CLI) took about 72 h. The ATCC+MET strain took 48 h. The ATCC+CLI, P34+CLI and P34+MET strains

took 72 h, while the P50+MET strain took 96 h.

A delay of 15 h for *B. fragilis* ATCC 25285 grown in medium with sub-MIC of MET, and 33 h cultured with sub-MIC of CLI (Figure 1A) was observed as compared to the same bacterium grown without antimicrobial. The clinical strain P-34 showed a delay of 36 h when grown in medium with sub-MIC of MET and 30 h cultured in sub-MIC of CLI as compared to the same strain cultured without antimicrobial (Figure 1B). The clinical strain P50 had a delay of 60 h when cultured in medium with METY, and 9 h in medium with CLI as compared to the same strain cultured without antimicrobials (Figure 1C).



**Figure 1** - Growth curve of the type strain *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (A) and fresh clinical *B. fragilis* P34 (B) and *B. fragilis* P50 (C) strains with or without addition of sub-MIC concentration of piperacillin/tazobactam, metronidazole or clindamycin antibiotics. Bacterial strains were grown in Brucella media containing the following antibiotics; piperacillin/tazobactam, metronidazole or clindamycin, at 1/2 concentration of the MIC previously determined. No antibiotic was added into the control cultures. Bacterial growth were determined by measuring OD at 550 nm.

Legend: OD: optical density; h: hours; PTZ: piperacillin/tazobactam, MET: metronidazole; CLI: clindamycin.

### 3.3 Evaluation of the pathogenicity of *B. fragilis* strains cultured in sub-inhibitory concentrations of PTZ, MET and CLI

#### 3.3.1 Cell morphology

The typical morphology of the *B. fragilis* ATCC25285, a Gram-negative rod, is presented on Figure 2A. The clinical strains (ATCC25285, P34 and P50), cultured in the presence of sub-MICs PTZ (Figure 2B, C and D respectively) and MET (Figure 3A, B and C, respectively) exhibited cells with filamentous appearance.

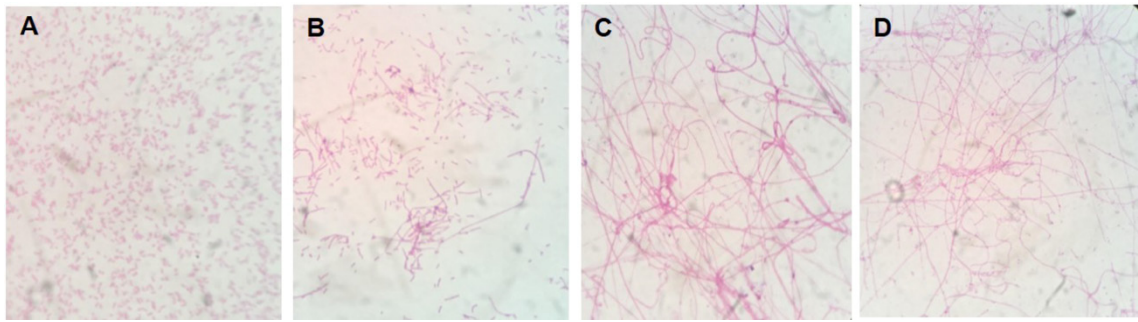


Figure 2. Gram staining of the *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 reference strain and clinical isolates of *Bacteroides fragilis* strains (P34 and P50) cultivated in Brucella media containing piperacillin/tazobactam at 1/2 concentration of the MIC previously determined (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Legend: A- *B. fragilis* ATCC 25285 strain cultured without antimicrobial; B- *B. fragilis* ATCC 25285 strain cultivated in sub-MIC of PTZ; C- *B. fragilis* P 34 cultivated in sub-MIC of PTZ; and D- *B. fragilis* P 50 cultivated in sub-MIC of PTZ.

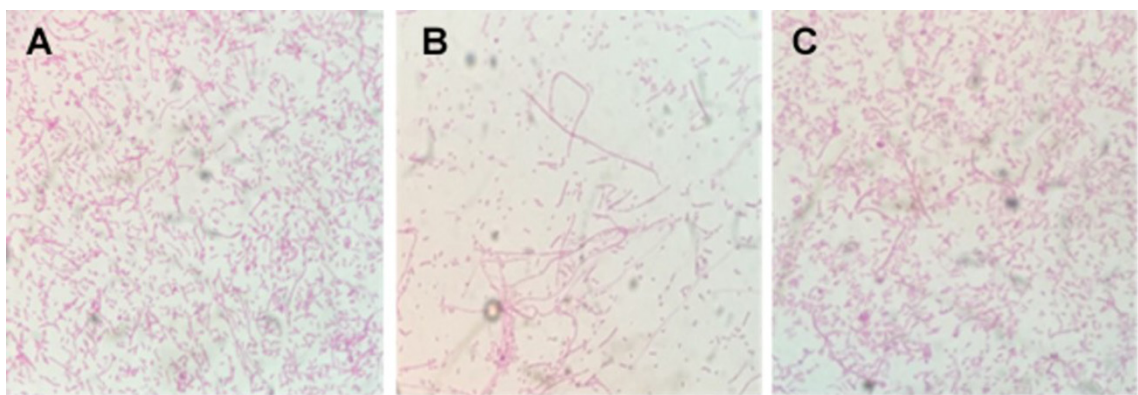


Figure 3. Gram staining of the *Bacteroides fragilis* ATCC25285 and clinical *Bacteroides fragilis* s

Legend: A- *B. fragilis* ATCC 25285 strain in sub-MIC of MET (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); B- *B. fragilis* P34 cultivated in sub-MIC of MET (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); C- *B. fragilis* P50 cultivated in sub-MIC of MET. trains (P34 and P50) cultivated in Brucella media containing metronidazole at concentrations ranging from 5 to 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 3.3.2 Capsule detection

With the methodology used, it was not possible to visualize the presence of a capsule in all *B. fragilis* strains cultured in medium with or without sub-MICs of the three antimicrobials.

### 3.3.3 Resistance to $\text{H}_2\text{O}_2$ , Biofilm formation and Cell surface hydrophobicity

Table 2 shows that linear regression was used to compare the dependent variable of 'diameter of the zone of inhibition' with the independent variables of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations (1%, 5%, 10% and 20%) and *B. fragilis* strains (reference and clinical). The constant ( $\_$  cons) that represents the medium size of ZI (mm) obtained by the reference strain without exposure to antimicrobials in the presence of the lowest concentration of hydrogen peroxide (1%). P50 strain previously cultured in a sub-MIC of PTZ showed the highest

halo ( $p < 0.01$ ), which is considered the most sensitive of all tested strains.

Table 2 also exhibits the result of linear regression analysis considering biofilm formation as a dependent variable (value obtained by dividing the  $OD_a$  by the  $OD_c$ ) and comparing that to the independent variable (bacterial strains) and the constant (\_cons) which was represented by *B. fragilis* ATCC 25285 without antimicrobial exposure, and the mean OD division found was 1.47. The dependent variable hydrophobicity defined by MATS was compared with the bacterial strains. The constant represents the average percentage of hydrophobicity (46%) of the *B. fragilis* ATCC 25285 strain without previous exposure to antimicrobials (Table 2).

Independent variables	ZI size	p value	Dependent variables			
			Biofilm	p value	MATS	p value
_cons <sup>a</sup>	17.13	-	1.47	-	46	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)						
5	38.98	<0.01	-	-	-	-
10	45.92	<0.01	-	-	-	-
20	52.91	<0.01	-	-	-	-
<b><i>B. fragilis</i> Strains</b>						
ATCC + PTZ	17.68	0.46	2.07	0.58	44.5	0.66
ATCC + MET	16.55	0.44	1.2	0.80	25	<0.01
ATCC + CLI	14.81	<0.01	1.2	0.80	22.5	<0.01
P34	16.64	0.51	5.54	<0.01	50.5	0.44
P34 + PTZ	15.6	0.07	2.3	0.95	55	0.13
P34 + MET	15.71	0.09	4.4	0.01	33.5	0.05
P34 + CLI	16.65	0.52	2.84	0.22	36.5	0.11
P50	18.00	0.90	5.07	<0.01	48	0.72
P50 + PTZ	19.65	<0.01	5.2	<0.01	56.5	0.08
P50 + MET	14.72	<0.01	2.57	0.32	39.5	0.27
P50 + CLI	16.98	0.84	4.4	0.01	49.5	0.54

Table 2. Statistical analysis using linear regression of dependent variables (diameter of zone of inhibition in millimeters) and the independent variables (hydrogen peroxide at 1, 5, 10 and 20%, the ability of biofilm formation – represented by division of the OD of the strains by the OD of the negative control, Microbial Adhesion to Solvents – MATS and all tested *Bacteroides fragilis* strains – ATCC, P34 and P50).

Legend: ZI: zone of inhibition; MATS: Microbial Adhesion to Solvents; <sup>a</sup>\_cons: constant (represents the average [mean] size of ZI (mm) obtained by the reference strain without exposure to antimicrobials, in the presence of the lowest concentration of hydrogen peroxide (1%); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide; PTZ: Piperacillin/Tazobactam; MET: Metronidazole; CLI: Clindamycin; ATCC: *B. fragilis* ATCC 25285; P34 and P50: clinical strains.

### 3.3.4 Hemagglutination and haemolytic activity

None of the bacterial strains (reference or clinical) showed hemagglutination in the different blood types tested: human (A +, B +, AB + and O +), sheep and horse. All strains hemolyzed all tested blood types after 6 days of incubation in anaerobiosis at 37°C.

## 4 | DISCUSSION

There are several situations during the infectious process in which the microorganism is subjected to sub-MICs of antimicrobials for varied periods of time. This may not be able to eliminate the microorganism but could interfere with the expression of some pathogenicity factors and may result in the selection of resistant bacteria. These changes in the pathogenicity of *B. fragilis*, in the presence of sub-MICs of antimicrobials demonstrate their pathogenic potential, being able to provoke different interactions between the host and the bacterium (DE SOUZA FILHO *et al.*, 2012; VELOSO *et al.*, 2013).

According to studies on antimicrobial resistance with *B. fragilis*, rates of resistance to CLI in several countries are reported between 24% and 56% (KANGABA *et al.*, 2015; KOUHSARI *et al.*, 2019). On the other hand, there are few reports of resistance to PTZ and MET (SZÉKELY *et al.*, 2015; YIM *et al.*, 2015). In the present study, the clinical strain P34 was susceptible to the three tested antimicrobials, and the clinical strain P50 showed only resistant to clindamycin (MIC=1.024 µg/mL).

The literature reports an increase in the time of growth of bacteria submitted to the sub-MICs of some antimicrobials and different stresses. Veloso *et al.* (2013) observed a delay of 15 h for the beginning of the log phase of growth of *B. fragilis* grown in sub-MICs of PTZ, a fact that was not corroborated in our study. In addition, another study observed that *Escherichia coli*, when cultured in sub-MICs of PTZ, reached the peak of filamentous cells with 16 h of growth, presenting 82% of cells altered in morphology and complexity (DE ANDRADE *et al.*, 2016).

The growth curve performed in the present study demonstrated delays for the beginning of the log growth phase for the reference and the clinical strains (P34 and P50) when cultured in sub-MICs of both MET and CLI. There was also a decrease in OD when they were cultured in sub-MICs of the three antimicrobials. Some authors believe that this is due to the decrease of enzymes related to the energetic metabolism of the bacterium (VELOSO *et al.*, 2013; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

The formation of filamentous cells found in strains cultured in medium with sub-MICs of PTZ may be related to the fact that this antimicrobial interferes with bacterial cell wall synthesis by binding to penicillin-3 binding protein (PBP-3), which is responsible for cell septation during division. Thus, the strains continue the division process when in contact with the sub-MICs, but the septation does not occur (DE ANDRADE *et al.*, 2016). On the other hand, in relation to the sub-MICs of MET, changes in bacterial morphology appear to be related to the inhibition of autolytic enzymes that initiate septation (DINIZ *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2015).

However, when strains in the filamentous state were cultured in medium without sub-MICs of antimicrobials, the cells returned to their typical form, indicating that the morphological change was a transitory state. Therefore, it is possible that filamentous

cells represent the most sensitive subpopulations that were inhibited by the antimicrobials. However, the consequences of these morphological changes as pathogenicity factors and for clinical diagnosis are not well established (FREITAS *et al.*, 2015; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

The polysaccharide capsule of *B. fragilis* is one of the most important pathogenicity factors of this bacterium, as it is responsible for its success in abscess formation, protection against the host's immune system and cell and mucosal adhesion (NAKANO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2014). In our study, it was not possible to visualize the presence of a capsule in all the strains with the methodology used; however, it does not mean that these strains do not have capsule. As a result, the Chinese ink staining with diluted fuccin was used (MOLINARO *et al.*, 2009), but it was also not possible to visualize a capsule.

According to the literature, within the first 30 min of exposure to oxygen (O<sub>2</sub>) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *B. fragilis* induces the expression of at least 28 proteins as part of a complex response to oxidative stress, and the magnitude of this response seems to be related to the concentration level of the stressor agent (SUND *et al.*, 2008). These proteins include enzymes that detoxify reactive oxygen species, protect DNA, and provide energy for the synthesis of new proteins. Some of the first genes induced during exposure to O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are members of the OxyR regulatory gene, providing an immediate protective reaction to stress (SUND *et al.*, 2008).

In the oxidative stress test by exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in our study, when comparing the clinical *B. fragilis* strains without and with sub-MICs of the three antimicrobials, it was possible to verify that the strains, ATCC+PTZ, ATCC+MET, P34+CLI and P50+PTZ, previously cultured in medium with antimicrobials sub-MIC were more sensitive to this substance in relation to the same strains without sub-MICs, mainly in the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%. This higher sensitivity was observed in all strains when the culture medium of the test plate also contained antimicrobial sub-MICs of antimicrobials (named by us as 2X test), in agreement with the results of Fonseca *et al.* (2004).

The increase in the sizes of ZI due to the presence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobials in the culture medium is believed to be due to a decrease in the production of enzymes such as peroxidases and catalases. These enzymes are responsible for protecting the bacteria from damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The lack or decrease in these enzymes may explain the lower capacity of the bacteria to survive and multiply in the presence of oxidative stress (FONSECA *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

It is believed that the increase in the sizes of ZI in the tests in which antimicrobials were used at sub-MICs in the culture media and 2X test may be due to actions of the antimicrobials themselves, although in a sub-MIC concentration, there is a decrease or lack of response to oxidative stress (such as production of catalases and other peroxidases) (FONSECA *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

Only the ATCC+CLI and P50+MET strains had statistically significant (p <0.01)

resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, that is, they showed a decrease in the size of halos, but the reasons were not elucidated, due to the lack of studies relating sub-MICs with oxidative stress. In addition, since sub-MICS of both CLI and MET did not decrease the size of the halos of the other strains tested, it is not possible to state that these antimicrobials increased the resistance to oxidative stress.

According to the literature, antimicrobials may interfere with bacterial adhesion to both epithelial and intestinal cells, as well as expression of other pathogenicity factors in various bacterial species (FREITAS *et al.*, 2015). Some antimicrobials may significantly decrease the bacterial adhesion process to certain types of surfaces, which can be explained by a change in the hydrophobicity of the cell surface, inhibition of motility, or possible decrease of the adhesins in the bacterial cell surface due to the induction of filamentous cells (FONSECA *et al.*, 2004).

Sub-inhibitory concentrations of antimicrobials could interfere with cell adhesion, hydrophobicity, motility, and the formation of biofilm. It also may affect other necessary factors for the formation of biofilm, such as the quorum sensing system, which is essential for communication between cells and is essential for proper training and maintenance of biofilm (OKAMOTO *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

Although some studies have shown that sub-MICs of both PTZ and MET decreased the formation of biofilm and that CLI may increase the same, our results were not able to demonstrate these effects, probably due to the low number of strains tested (OKAMOTO *et al.*, 2002; DE SOUZA FILHO *et al.*, 2012; DE ANDRADE *et al.*, 2016).

The three strains previously cultured in the medium with and without sub-MICs of the three antimicrobials showed a hydrophilic character. This may be due to the presence of capsules in *B. fragilis*, which are generally hydrophilic and may contribute to the low hydrophobicity (REIS *et al.*, 2014). Although it was not possible to apply statistical treatment in our study, it was possible to observe that sub-MICs of MET decreased the hydrophobicity of the three strains, and CLI decreased the hydrophobicity of the reference strain and the clinical strain P34 as compared to the strains without sub-MICs of antimicrobials. According to the literature, this decrease in hydrophobicity may occur due to some alterations in bacterial surface structures, especially loss of fimbriae and adhesins (FONSECA *et al.*, 2004). However, there are no studies that relate hydrophobicity to sub-MICs of MET or CLI, and we can not yet clarify this lower hydrophobicity.

Although our study found a 10.5% increase in the hydrophobicity of the P50 strain previously cultured in sub-MICs of PTZ compared to the reference strain without sub-MICs of antimicrobials an increase in hydrophobicity of the two clinical strains in relation to strains without sub-MICs of antimicrobials, Andrade *et al.* (2016) observed a significant decrease in the hydrophobicity of *E. coli* with sub-MICs of PTZ. Fonseca *et al.* (2004) also observed a decrease in the hydrophobicity of *Pseudomonas aeruginosa* with sub-MICs of PTZ, attributing this fact to the changes in the bacterial surface structure, in particular the

fimbriae, which contribute to the hydrophobicity of *P. aeruginosa*. Therefore, no reports discussing whether or not PTZ increases hydrophobicity were found.

Due to the fact that our strains are classified as weakly to moderately hydrophobic, it is possible that hydrophobicity does not exert a significant influence on tissue adhesion and, consequently, the formation of *B. fragilis* biofilms. Okamoto et al. (2002) observed that hydrophobicity in *Fusobacterium nucleatum* was not associated with adhesion in the host's buccal cells and suggested that the mechanism of bacterial adhesion in these species was influenced by the presence of adhesins located in the cell wall or the outer membrane.

While one study observed hemagglutination activity in 84% of clinical strains of *B. fragilis*, others did not significantly observe this ability in strains in different blood types, such as human, horse, sheep, rabbit, dog (NAKANO & AVILA-CAMPOS, 2004; REIS *et al.*, 2014). In our study, no hemagglutination was observed in any strain previously cultured with or without sub-MICs of the three evaluated antimicrobials in all blood types tested. Nakano and Avila-Campos (2004) suggested that the adhesins or outer membrane proteins of the bacterium may be responsible for hemagglutination.

Hemolytic activity is a means of providing bacteria with heme iron from blood cells. However, the precise mechanism and the actions of each hemolysin gene still need to be clarified (SUZUKI *et al.*, 2012). Robertson and coworkers (2006) found that *B. fragilis* hemolysin *hlyA* gene produced  $\alpha$ -hemolysis and  $\beta$ -hemolysis when combined with *hlyB* gene. The authors also suggested that *B. fragilis* genes *hlyA* and *hlyB* could be combined to form a two-component hemolysin, increasing their individual hemolytic activities. However, Suzuki and colleagues (2012) suggested that hemolysin encoded by the *hlyA* gene of *Prevotella intermedia* may act differently from that encoded by the *hlyA* gene of *B. fragilis*. We agree that the expression of hemolysin genes and their respective activities should be better investigated in the future in an attempt to clarify the results obtained.

In our study, all evaluated strains previously cultured with or without sub-MICs of all three antimicrobials had hemolysis in all blood types tested after 6 days of incubation. A study by Robertson et al. (2006) found that all strains (reference and clinical), showed hemolysis in human, sheep and horse blood.

However, one strain had hemolysis in horse blood, but not in human and sheep blood. These differences suggested that the hemolytic activity produced by *B. fragilis* can be influenced by the diversity of the strains, the origin of the red blood cells and the growth conditions. In addition, the long period of incubation to visualize hemolysis (6 days) suggests that the apparent lack of hemolytic phenotype in clinical strains of *B. fragilis* may be a consequence of the short incubation period (48 h) which is generally used by laboratories to perform the test (LOBO *et al.*, 2013). This fact was observed by Reis and coworkers (2014), as the hemolysis test in horse blood was negative for the 13 strains of *B. fragilis* used in the study.



## 5 | CONCLUSIONS

Some alterations found in *B. fragilis* strains due to the presence of sub-MICs of the antimicrobials tested in our study may reflect the pathogenic potential of these microorganisms. There was an interesting response of the clinical strain P50 when exposed to sub-MICs of PTZ. After sub-MICs exposition, the strain enhanced its ability of biofilm formation ( $p=0.002$ ), became more resistant to  $H_2O_2$  exposition ( $p=0,001$ ) and also increased its hydrophobicity ('p' presented an interesting value:  $p=0.08$ , but it was not considered statistically significant for this study, despite clearly demonstrate a tendency to be statistically relevant). In addition, it is important to emphasize that physiological changes may affect the diagnosis and treatment of infections with *B. fragilis*. Therefore, our data highlighted the risks of inadequate treatment, not only related to the selection of antimicrobial resistance but also related to the implications for clinical microbiology and the evolution of infectious diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the following governmental agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) for the financial support. We also thank Dr. Edson Rocha from East Carolina University for the kind revision of this article.

## REFERENCES

- CHANDAD, F.; MOUTON, C. Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun**, 63, n. 12, p. 4755-4763, Dec 1995.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. USA: CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100 27ed. 2017.
- DE ANDRADE, J. P.; DE MACÊDO FARIAS, L.; FERREIRA, J. F.; BRUNA-ROMERO, O. *et al.* Sub-Inhibitory Concentration of Piperacillin-Tazobactam May be Related to Virulence Properties of Filamentous *Escherichia coli*. **Curr Microbiol**, 72, n. 1, p. 19-28, Jan 2016.
- DE SOUZA FILHO, J. A.; DINIZ, C. G.; BARBOSA, N. B.; DE FREITAS, M. C. *et al.* Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Anaerobe**, 18, n. 6, p. 566-575, Dec 2012.
- DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. D. *et al.* Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistant *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrob Agents Chemother**, 44, n. 9, p. 2419-2423, Sep 2000.
- DONELLI, G.; VUOTTO, C.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 65, n. 2, p. 318-325, Jul 2012.

- DOS SANTOS, S. G.; DE CARVALHO, M. A.; SERUFO, J. C.; PINTO-SILVA, R. A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of microorganisms recovered from intraabdominal infections at Belo Horizonte, Brazil. **Am J Infect Control**, 32, n. 7, p. 414-416, Nov 2004.
- DOS SANTOS, K. V.; DINIZ, C. G.; COUTINHO, S. C.; APOLÔNIO, A. C. *et al.* In vitro activity of piperacillin/tazobactam and ertapenem against *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* in pure and mixed cultures. **J Med Microbiol**, 56, n. Pt 6, p. 798-802, Jun 2007.
- FERREIRA, J. F. G.; REZENDE-NETO, J. B.; PINTO-SILVA, R. A.; SOUZA, J. G. *et al.* Microbiota Evaluation and Extracellular Cytokine Profile in Patients Affected with Intra-abdominal Infection. **British Journal of Medicine & Medical Research**. 15: 103-113 p. 2016.
- FONSECA, A. P.; EXTREMINA, C.; FONSECA, A. F.; SOUSA, J. C. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, 53, n. Pt 9, p. 903-910, Sep 2004.
- FREITAS, M. C.; SILVA, V. L.; GAMEIRO, J.; FERREIRA-MACHADO, A. B. *et al.* *Bacteroides fragilis* response to subinhibitory concentrations of antimicrobials includes different morphological, physiological and virulence patterns after in vitro selection. **Microb Pathog**, 78, p. 103-113, Jan 2015.
- HRV, R.; DEVAKI, R.; KANDI, V. Comparison of Hemagglutination and Hemolytic Activity of Various Bacterial Clinical Isolates Against Different Human Blood Groups. **Cureus**, 8, n. 2, p. e489, Feb 2016.
- KANGABA, A. A.; SAGLAM, F. Y.; TOKMAN, H. B.; TORUN, M. *et al.* The prevalence of enterotoxin and antibiotic resistance genes in clinical and intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey. **Anaerobe**, 35, n. Pt B, p. 72-76, Oct 2015.
- KOS, B.; SUSKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; SIMPRAGA, M. *et al.* Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J Appl Microbiol**, 94, n. 6, p. 981-987, 2003.
- KOUHSARI, E.; MOHAMMADZADEH, N.; KASHANIZADEH, M. G.; SAGHAFI, M. M. *et al.* Antimicrobial resistance, prevalence of resistance genes, and molecular characterization in intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates. **APMIS**, 127, n. 6, p. 454-461, Jun 2019.
- LIU, C.; SONG, Y.; MCTEAGUE, M.; VU, A. W. *et al.* Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. **FEMS Microbiol Lett**, 222, n. 1, p. 9-16, May 2003.
- LOBO, L. A.; JENKINS, A. L.; JEFFREY SMITH, C.; ROCHA, E. R. Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model. **Microbiologyopen**, 2, n. 2, p. 326-337, Apr 2013.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4.** . Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saude Joaquim Venancio, 2009.
- NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from stool of children with diarrhea in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99, n. 3, p. 307-312, May 2004.
- NAKANO, V.; PIAZZA, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; BUERIS, V. *et al.* Adherence and invasion of Bacteroidales isolated from the human intestinal tract. **Clin Microbiol Infect**, 14, n. 10, p. 955-963, Oct 2008.
- OKAMOTO, A. C.; JARDIM, E. G.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33, p. 178-184, 2002.

REIS, A. C.; SILVA, J. O.; LARANJEIRA, B. J.; PINHEIRO, A. Q. *et al.* Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts. **Braz J Microbiol**, 45, n. 2, p. 647-650, 2014.

ROBERTSON, K. P.; SMITH, C. J.; GOUGH, A. M.; ROCHA, E. R. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. **Infect Immun**, 74, n. 4, p. 2304-2316, Apr 2006.

SOLOMKIN, J. S.; MAZUSKI, J. E.; BRADLEY, J. S.; RODVOLD, K. A. *et al.* Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, 50, n. 2, p. 133-164, Jan 2010.

SUND, C. J.; ROCHA, E. R.; TZIANABOS, A. O.; TZINABOS, A. O. *et al.* The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. **Mol Microbiol**, 67, n. 1, p. 129-142, Jan 2008.

SUZUKI, N.; FUKAMACHI, H.; ARIMOTO, T.; YAMAMOTO, M. *et al.* Contribution of hly homologs to the hemolytic activity of *Prevotella intermedia*. **Anaerobe**, 18, n. 3, p. 350-356, Jun 2012.

SZÉKELY, E.; EITEL, Z.; MOLNÁR, S.; SZÁSZ, I. *et al.* Analysis of Romanian *Bacteroides isolates* for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. **Anaerobe**, 31, p. 11-14, Feb 2015.

TEIXEIRA, F. L.; PAUER, H.; COSTA, S. B.; SMITH, C. J. *et al.* Deletion of BmoR affects the expression of genes related to thiol/disulfide balance in *Bacteroides fragilis*. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 14405, Sep 2018.

VELOSO, L. E. C.; DOS SANTOS, K. V.; DE ANDRADE, H. M.; PIRES, S. A. F. *et al.* Proteomic changes in *Bacteroides fragilis* exposed to subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam. **Anaerobe**, 22, p. 69-76, Aug 2013.

YIM, J.; LEE, Y.; KIM, M.; SEO, Y. H. *et al.* Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group organisms recovered from 2009 to 2012 in a Korean hospital. **Ann Lab Med**, 35, n. 1, p. 94-98, Jan 2015.

## EFICÁCIA DE ÁLCOOL GEL COMO ANTIMICROBIANO DE SUPERFÍCIES INERTES

Data de aceite: 01/06/2020

### **Cristiane Coimbra de Paula**

Laboratório Carlos Chagas, Microbiologia, Cuiabá – MT; UNIVAG – Centro Universitário, Curso de Medicina, Várzea Grande – MT.

<http://lattes.cnpq.br/0509789646424291>

### **Fabício Caram Vieira**

UNIVAG – Centro Universitário, Curso de Farmácia, Várzea Grande – MT.

<http://lattes.cnpq.br/6395444595464866>

### **João Pedro Castoldo Passos**

UNIVAG – Centro Universitário, Curso de Medicina, Várzea Grande – MT.

<http://lattes.cnpq.br/0947713230885041>

### **Caroline Aquino Vieira de Lamare**

Médica Patologista Clínica, Cuiabá-MT.

<http://lattes.cnpq.br/3855205500775110>

### **Walkiria Shimoya-Bittencourt**

UNIVAG – Centro Universitário, Curso de Medicina, Várzea Grande – MT; Universidade de Cuiabá, Mestrado em Ambiente e Saúde, Cuiabá – MT.

<http://lattes.cnpq.br/8479171642259186>

**RESUMO:** O álcool é um composto comumente utilizado em instituições de saúde e estabelecimentos comerciais para realização de procedimentos de antisepsia tanto dos

seus materiais como das suas superfícies que podem estar contaminadas por microrganismos. Portanto, este estudo tem por objetivo testar a eficácia do álcool gel na assepsia de superfícies. Foram utilizadas três marcas de álcool em gel. As amostras foram divididas aleatoriamente em quatro grupos correspondendo o grupo 1 ao controle (sem desinfecção) e grupos 2 a 4 referentes as diferentes marcas de álcool gel. Para os grupos 2 a 4 foi observado o efeito do álcool frente ao tempo de desinfecção obedecendo à ordem de cinco (T5), dez (T10) e quinze (T15) minutos após a desinfecção. As amostras coletadas foram colocadas em molde estéril. As semeaduras foram realizadas utilizando placas de petri com agar nutriente e *plate count agar* para teste de crescimento de bactérias e placas de petri contento agar sabouraud acrescido de cloranphenicol (100 µl) para isolamento de fungos. Após 24 horas foi analisado o crescimento bacteriano e de 7 a 10 dias as análises para fungos foram realizadas. Foi observado diminuição acentuado do número de colônias bacterianas dos grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo 1, principalmente nos tempos T0, T5 e T10. Em todos os grupos foi observado crescimento fúngico independentemente dos tempos testados para desinfecção do álcool gel. Conclui-se que o álcool gel apresenta eficácia

na antissepsia das superfícies por um curto período e apenas no controle bacteriológico, pois não apresentou eficácia na eliminação dos fungos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antissepsia, Agentes de Controle de Microrganismos, Álcool gel.

## EFFECTIVENESS OF ALCOHOL GEL AS ANTIMICROBIAL OF INERT SURFACES

**ABSTRACT:** Alcohol is a compound commonly used in health facilities and commercial establishments to perform antiseptic procedures on both their materials and their surfaces that may be contaminated by microorganisms. Therefore, this study aims for to test the efficacy of alcohol gel in the asepsis of surfaces. Three brands of alcohol in gel were used. The samples were randomly divided into four groups corresponding to group 1 to control (without disinfection) and groups 2 to 4 referring to the different brands of alcohol gel. For groups 2 to 4, the effect of the alcohol against the disinfection time was observed obeying the order of five (T5), ten (T10) and fifteen (T15) minutes after disinfection. The collected samples were placed in a sterile mold. Seeds were harvested using petri dishes with nutrient agar and plate count agar for bacterial growth test and petrel plates containing sabouraud agar plus chloranphenicol (100 µl) for fungal isolation. After 24 hours the bacterial growth was analyzed and from 7 to 10 days the analyzes for fungi were performed. A marked decrease in the number of bacterial colonies of groups 2, 3 and 4 was observed in relation to group 1, mainly in times T0, T5 and T10. Fungal growth was observed in all groups regardless of the times tested for gel alcohol disinfection. It is concluded that alcohol gel showed efficacy in the antiseptic of the surfaces for a short period of time and only in the bacteriological control, since it did not present efficacy in the elimination of fungi.

**KEYWORDS:** Antiseptic, Microorganism Control Agents, Alcohol gel.

## 1 | INTRODUÇÃO

Em geral a utilização de produtos químicos com ação germicida e bactericida é antiga, sendo citada por Homero, em sua obra “A Odisseia” por volta de 800 a.c, e é sem dúvida, uma maneira eficaz de prevenir a proliferação de microrganismos, bem como realizar seu controle e destruição (ANDRADE et al., 2002).

Álcoois são compostos químicos, orgânicos, amplamente utilizados em instituições de saúde, bem como em restaurantes e lanchonetes, para realização de procedimentos de antissepsia tanto dos seus utensílios como das suas superfícies. Quimicamente são compostos por grupamento hidroxila (-OH) ligados a um radical alquila, podendo ser preparado a partir de muitas classes de compostos alquenos, halogenetos de alquila, cetonas, ésteres, aldeídos, entre outras, como também gerar um grande número de outros compostos (UCKO, 1992).

Uma das variações de álcool comumente utilizada é o álcool gel, sendo atualmente muito aplicado em procedimentos de antissepsia das mãos e de superfícies. Além disso,

o seu uso representa uma prática frequente tanto em ambientes de saúde, como em estabelecimentos comerciais, substituindo muitas vezes a própria lavagem das superfícies e o uso de outras substâncias antissépticas (HERNADES, et al. 2004).

As superfícies também estão sujeitas a contaminação de microrganismos. E quando contaminadas podem causar sérias complicações e doenças para o ser humano (ANDRADE, et al. 2007).

Desta forma, torna-se importante não apenas aplicar a substância antisséptica, mas conhecer sua eficácia. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a eficácia do álcool gel na assepsia de superfícies.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental com amostras coletadas das superfícies das mesas de uma lanchonete de uma instituição de ensino superior. As amostras foram coletadas antes e após a desinfecção das mesmas. Foram utilizadas três marcas de álcool gel diferentes e de fácil acesso no mercado.

As amostras foram divididas aleatoriamente em quatro grupos: grupo 1 (G1) - sem desinfecção; grupo 2 (G2) - desinfecção com álcool gel da marca 1; grupo 3 (G3) - desinfecção com álcool gel da marca 2; grupo 4 (G4) - desinfecção com álcool gel da marca 3.

Foi utilizada a técnica de swab de superfície para coleta das amostras. O swab estéril foi devidamente umedecido em água peptonada, retirado o excesso na borda interna do tubo, para facilitar a coleta. Também foi utilizado um molde estéril para dividir as áreas da superfície a serem desinfetadas com as três marcas de álcool gel. Utilizou-se o algodão estéril embebido em álcool gel realizando-se movimentos retilíneos sempre no mesmo sentido. As coletas foram realizadas em quatro tempos devidamente cronometrados: o tempo zero (T0) - logo após a desinfecção, tempo 5 minutos (T5) após a desinfecção, tempo 10 (T10) minutos após a desinfecção e tempo 15 (T15) minutos após a desinfecção. Os swab's foram armazenados e transportados em tubos de ensaio estéril.

Após a finalização das coletas os swab's foram levados ao laboratório de microbiologia do UNIVAG - Centro Universitário para a realização dos procedimentos microbiológicos. As semeaduras foram realizadas utilizando placas de petri com agar nutriente (AN) e *plate count agar* (PCA) para teste de crescimento de bactérias e placas de petri contendo agar sabouraud (AS) acrescido de cloranfenicol (100 µl) para isolamento de fungos. As placas contendo meio de cultura foram incubadas em estufa 25-30° C para crescimento de microrganismo no período de 24 a 48 horas para as análises bactérias e de 7 a 10 dias para análise dos microrganismos fúngicos.

### 3 | RESULTADOS

Foi observado crescimento de colônias de bactérias nos dois meios de cultura utilizados, porém houve grande diminuição do número de colônias nas placas dos grupos G2, G3 e G4 em relação ao G1, principalmente nos tempos T0, T5 e T10. Já no tempo T15 em ambos os grupos houve crescimento de uma quantidade maior de colônias de bactérias, conforme demonstrada nas figuras de 1 a 3 abaixo.

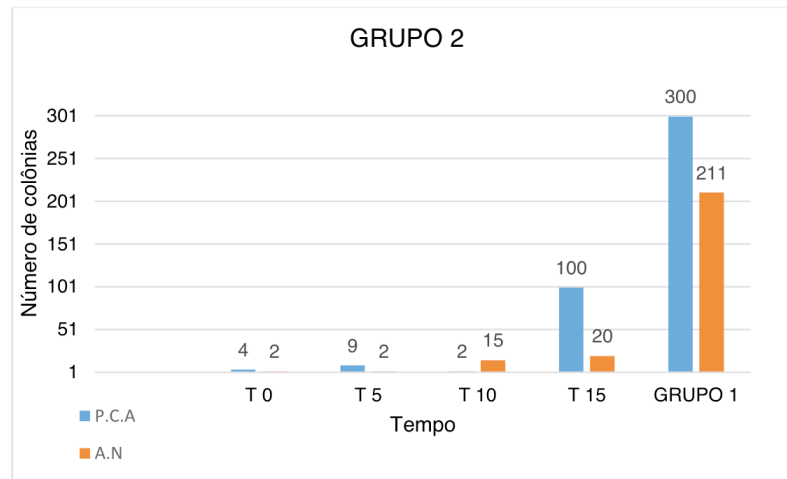


Figura 1: Gráfico do crescimento bacteriano nas placas do grupo 2 em relação ao tempo da coleta e ao grupo 1.

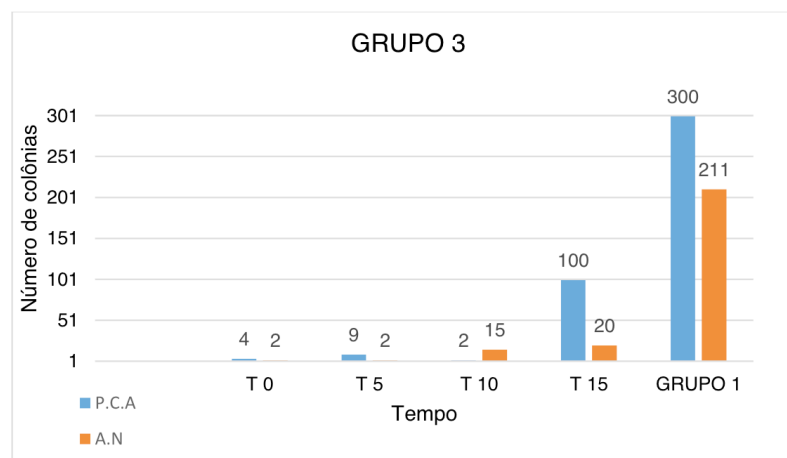


Figura 2: Gráfico do crescimento bacteriano nas placas do grupo 3 em relação ao tempo da coleta e ao grupo 1.

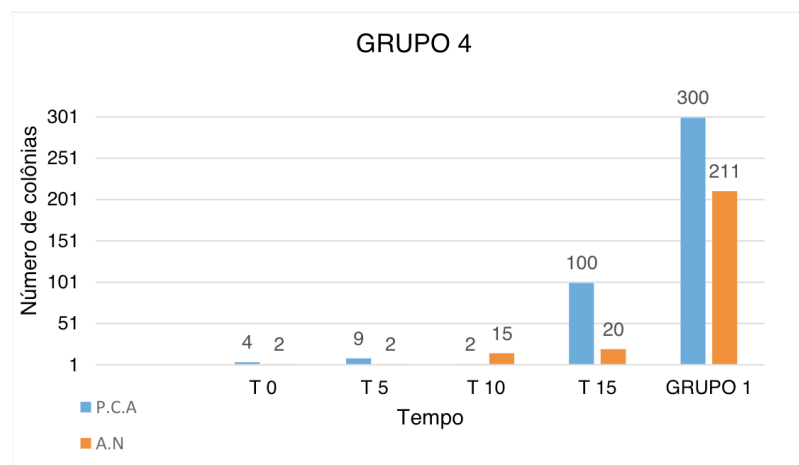


Figura 3: Gráfico do crescimento bacteriano nas placas do grupo 4 em relação ao tempo da coleta e ao grupo 1.

As placas contendo AS para crescimento de fungos foram incubadas por 96 horas e após a análise das mesmas foram identificadas as seguintes espécies fúngicas. No grupo 1 obtivemos crescimento da espécie *Cladosporium* no T10 (tabela 1).

Na placa referente ao G2 foram observados os seguintes crescimentos: no T0 a espécie *Rhizopus stolonifer*; T5 a *Aspergillus clavatus*; no T10 não houve crescimento em T15 a espécie *Fusarium verticillioides*, conforme demonstrado na tabela 1.

Já na placa referente ao G3 desenvolveu: em T5 identificou-se a espécie *Fusarium solani*, e *Cladosporium cladosporioides*; T10 *Saccaromyces* spp; as placas referentes a T0 e T15 não houve crescimento (tabela 1)

No grupo 4 foi observado: no T0 a espécie *Saccaromyces*; T5 a *Curvularia lunata*; T10 a *Saccaromyces* e *Aspergillus tereús*; e no T15 a *Saccaromyces* spp, *Cladosporium* spp, *Rhizopus stolonifer*. (tabela 1)

	T0	T5	T10	T15
<b>Grupo 1</b>				Cladosporium
<b>Grupo 2</b>	Rhizopus stolonifer	Aspergillus clavatus	-	Fusarium verticillioides
<b>Grupo 3</b>	-	<i>Fusarium solani</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Saccaromyces</i> spp	-
<b>Grupo 4</b>	<i>Saccaromyces</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Saccaromyces</i> <i>Aspergillus tereús</i>	<i>Saccaromyces</i> spp <i>Cladosporium</i> spp <i>Rhizopus stolonifer</i>

Tabela 1. Espécies fúngicas encontradas nos grupos de acordo com o tempo de desinfecção.

Legenda: T0: imediatamente após desinfecção; T5: cinco minutos após desinfecção; T10: dez minutos após desinfecção; T15: quinze minutos após desinfecção.



## 4 | DISCUSSÃO

O álcool gel por ser um produto de baixo custo e com boa atividade antimicrobiana tornou-se o produto mais utilizado para assepsia de mãos, objetos e superfícies principalmente nos ambientes de saúde, faltando apenas para melhor aproveitamento de suas propriedades observar o seu tempo de ação (HERNANDES et al., 2004).

A preocupação com o tempo de eficácia da propriedade antimicrobiana do álcool gel deve ser rigorosamente aplicada nos ambientes de saúde ou qualquer outro como forma de higienização, uma vez que em estudos realizados foi comprovado que as mãos dos profissionais da saúde possuem um papel muito importante na cadeia de transmissão das doenças infecciosas, fato que se traduz em um número acentuado de mortes e aumento na gravidade das doenças (SANTOS, *et al.* 2010)

Com relação às técnicas microbiológicas aplicadas nesse estudo para a avaliação da atividade antimicrobiana do álcool gel, foi observada que as amostras coletadas mostraram diferenças quando em comparação com a amostra do grupo 1. Diante desses resultados é possível especular alguns aspectos que talvez justifiquem o mecanismo de ação do álcool frente às técnicas empregadas.

A formulação e a consistência de determinados produtos podem contribuir com ação positiva ou negativa frente os microrganismos. Andrade e colaboradores (2007) observaram este questionamento quando realizaram atividade antimicrobiana com álcool gel 70% frente a bactérias de uma comunidade hospitalar.

Outro fator importante seria, em relação à formulação, a consistência em gel que pode aumentar o tempo de contato do álcool com a superfície e os microrganismos, pois retarda o seu tempo de evaporação, quando comparado com a forma líquida, que apresenta menor tempo de contato. Neste caso, o processo de evaporação acontece de maneira mais rápida facilitando a fixação dos microrganismos. Além disso, muitas vezes pelo fato da evaporação ser rápida, seu efeito antimicrobiano torna-se pouco efetivo. Seguindo esta premissa, os resultados alcançados nesta pesquisa entram em conformidade com Andrade *et al.*, (2007), Andrade *et al.*, (2002) e Paulson *et al.*, (1999).

Por outro lado, Paulson e colaboradores (1999) recomendam a utilização com água e sabão depois de 5 fricções com álcool-gel. Esta mesma orientação foi observada por Souza e colaboradores (1998) em materiais médicos cirúrgicos. A instrução da lavagem se deve ao fato de o produto (álcool) se tornar menos efetivo na presença de sujidade e/ou matéria orgânica. Isso se deve ao fato de que os principais fatores que interferem na ação antimicrobiana do álcool gel sejam: a presença de matéria orgânica, tipo e nível de contaminação, resistência intrínseca do microrganismo, concentração, tempo de exposição ao agente desinfetante, característica do material ou tipo de atividade, temperatura e pH (LAWRENCE 1992; RUTALA 1996, SOUZA *et al.*, 1998).

Apesar disso, é importante lembrar-se da higienização das mãos, uma vez que uma

boa fricção neste ato pode atingir resultados bem parecidos com o uso de substâncias antimicrobianas. Dessa forma, evitando-se o uso demasiado de soluções que podem levar a multirresistência dos microrganismos as substâncias mais comuns. (MONNAZZI, *et al.*, 2012)

A literatura científica (ANDRADE *et al.*, 2002; PAULSON *et al.*, 1999, MONNAZZI *et al.*, 2012) aborda o uso da solução alcoólica em procedimento de assepsia, especialmente, na higienização das mãos de profissionais da saúde. Autores americanos (KAMPF *et al.*, 2006; WINNENFELD *et al.*, 2000) em suas casuísticas, abordam ainda, a ação da higienização das mãos e a redução na contaminação após o uso das soluções alcólicas eleva o índice de adesão ao procedimento de higienização, e conseqüentemente parece contribuir na diminuição das taxas de infecção.

Entretanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO (2005) ainda há contradições em relação ao álcool gel quanto a sua efetividade na presença da matéria orgânica e ainda como produto desinfetante (ROTTER *et al.*, 1991).

Em geral, os álcoois são produtos indicados na desinfecção de superfícies de mobiliários, equipamentos, artigos médico-hospitalares e consultórios odontológicos, pela atividade antimicrobiana e praticidade de uso. Para desinfecção de superfícies, precedida ou não da limpeza com água e sabão, recomendam-se três aplicações intercaladas de álcool a 70% p/v de concentração e secagem natural, conforme recomendação da literatura nacional (UCKO, 1992).

Neste estudo, apesar de serem utilizadas três marcas diferentes de álcool gel existentes no mercado, não se tem a pretensão induzir a comercialização dos produtos que foram eficazes, uma vez que o foco do estudo foi testar o álcool gel e seu efeito antimicrobiano e não a propaganda das marcas.

## 5 | CONCLUSÃO

Com base nos dados coletados pode-se concluir que o álcool gel apresenta boa eficácia na antissepsia das superfícies. Porém, se faz necessário a conscientização de que sua eficácia se dá por um curto período e apenas no controle bacteriológico, pois não apresentou eficácia na eliminação dos fungos.

Apesar de não ser o único método eficaz de assepsia devendo seu uso ser controlado, esses achados apontam à necessidade de mais estudos que possam validar novas técnicas microbiológicas para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de álcool géis. Assim, antes de utilizar alguma substância ou produto contra microrganismos é necessário avaliar previamente a sua eficácia com técnicas ou métodos microbiológicos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D; et al. Álcoois: a produção do conhecimento com ênfase na sua atividade antimicrobiana. **Medicina**, Ribeirão Preto; v. 35, p 7-13, 2002.
- ANDRADE, D; et al. Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitaleras e da comunidade. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 40, n.2, p. 250-4, 2007.
- SANTOS, A.A.M; et al. Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. **Rev. adm. saúde**; v, 4, n. 16, p. 7-14, jul.-set. 2002.
- HERNANDES, S.E.D; et al. The affectivennes of alcohol gel and oyher hand-cleasing agentes aginst importante nosocomial pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.33-39, 2004.
- MONNAZZI, M.S; et al. Estudo microbiológico comparativo entre sabão de clorexidina 2% e um novo sabão antisséptico para lavagem pré-operatória das mãos. **Rev. Cir. Traumatologia. Buco-Maxilo-Facial**, Camaragibe, v.12, n.2, 105-112, 2012.
- PAULSON, D.S.; et al. A close look at alcohol gel as an antimicrobial sanitizing agent. **Am J Infect Control**; v. 27, p 332-8, 1999.
- KAMPF, G.; et al. Evaluation of two methods of determining the efficacies of two alcoholbased hand rubs for surgical hand antisepsis. **Appl Environ Microbiol**; v. 72, n. 6, p. 3856-61, 2006.
- WINNENFELD, M.; et al. Skin tolerance and effectiveness of two hand decontamination procedures in everyday hospital use. **Br J Dermatol**; v. 143, p. 546-50, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Guidelines on Hand Hygiene in Health Care, 2005.
- ROTTER, M.L.; KOLLER, W.; NEUMANN, R. The influence of cosmetic additives on the acceptability of alcohol-based hand disinfectants. **J Hosp Infect**; v. 18, n. Suppl B, p. 57-63, 1991.
- LAWRENCE, C. Testing alcohol wipes. **Nurs Times**; v. 88, p. 63-66, 1992.
- RUTALA, W.A. Guideline for selection and use of disinfectants. **Am J Infect Control**; v. 24, p. 313-314, 1996.
- SOUZA, A.C.S.; PEREIRA, M.S.; RODRIGUES, M.A.V. Descontaminação prévia de materiais médico cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. **Rev Latinoam Enf**; v.6, p. 95-105, 1998.
- UCKO, D.A. Compostos orgânicos oxigenados. In: **Química para as ciências da saúde uma introdução à química geral, orgânica e biológica**, 2ª ed, Manole, São Paulo, p.301-310, 1992.

## EVALUACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE NOVILLOS ALIMENTADOS CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Data de aceite: 01/06/2020

Data de submissão: 10/03/2020

**Vivian Fischer**

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<https://orcid.org/0000-0002-7670-7454>

**Maria Juliana Moncada Diaz**

Universidad Industrial de Santander

Bucaramanga – Santander

<https://orcid.org/0000-0001-7443-4993>

**Luciano Antônio Ritt**

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<https://orcid.org/0000-0003-2062-4622>

**Michele Bertoni Mann**

Instituto de Ciências Básicas da saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<https://orcid.org/0000-0003-3335-8837>

**Ana Paula Guedes Frazzon**

Instituto de Ciências Básicas da saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<https://orcid.org/0000-0002-1029-5776>

**Jeverson Frazzon**

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<https://orcid.org/0000-0002-0209-1466>

**RESUMEN:** Bacterias que portan genes de resistencia a antimicrobianos convencionales pueden encontrarse en sistemas de producción animal. Estos microorganismos podrían ser transmitidos a humanos por efluentes ambientales generando un riesgo para la salud pública. En este trabajo se evaluó la presencia de genes de resistencia en la microbiota de cuatro porciones del tracto gastrointestinal de un grupo de novillos cuya alimentación fue suplementada con extracto de orégano como alternativa al uso de aditivos antimicrobianos. Los genes de resistencia fueron detectados utilizando la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cuatro de los seis genes evaluados, *Tet(W)*, *Tet(M)*, *BlaTem* y *Erm(B)*, fueron encontrados en las porciones gastrointestinales de ambos grupos en estudio. El gen *Tet(M)* no fue detectado en el rumen. Fue posible comprobar que bacterias portadoras de genes de resistencia pueden establecerse en el microbioma de novillos lecheros independiente

de su dieta, puesto que no fueron suministrados aditivos antimicrobianos. Este estudio sugiere que existen otras vías de diseminación de resistencia y estas deben ser controladas y monitoreadas al igual que los alimentos de origen animal, ya que también pueden representar un alto riesgo para la salud humana.

**PALABRAS CLAVE:** Antibióticos, Bovinos, Resistencia, Tracto Gastrointestinal, Microbiota.

## EVALUATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES IN BACTERIA PRESENT IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF CALVES FEEDED WITH ORGAN EXTRACT

**ABSTRACT:** Bacteria with antimicrobial resistance genes can be found in animal production systems. These microorganisms could be transmitted to humans by environmental effluents, creating a risk to public health. The resistance genes were evaluated in four portions of gastrointestinal tract microbiota of calves whose feeding was supplemented with oregano extract as an alternative of antimicrobial additives. Resistance genes were detected using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Four of the six genes evaluated, *Tet(W)*, *Tet(M)*, *BlaTem* and *Erm(B)* were found in the gastrointestinal portions of both study groups. The *Tet(M)* gene was not detected in the rumen. It was discovered that bacteria with resistance genes can be established in the microbiome of the calves, independently of their diet, being that no antimicrobial additives were supplied. This study suggests that there are other pathways of resistance dissemination and these should be controlled and monitored as well as foods of animal production, because they may also pose a high risk to human health.

**KEYWORDS:** Antibiotics, Cattle, Resistance, Gastrointestinal Tract, Microbiota.

## 1 | INTRODUCCIÓN

Existe una preocupación global debido a las enfermedades causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos, puesto que su tratamiento es cada vez menos efectivo, estas infecciones pueden darse debido al uso inadecuado de fármacos antimicrobianos tanto en la población humana, como en animales domésticos o de producción. (Davies J, 2010, p 417-433). El suministro indiscriminado de antibióticos puede llevar a la selección y multiplicación de bacterias portadoras de genes de resistencia en el entorno cotidiano (Rocha C, 2015), convirtiéndose en un problema de gran importancia a nivel mundial.

En otros estudios se ha demostrado que el uso de fármacos antibióticos como aditivos en la producción animal aumenta la probabilidad de transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos convencionales en animales, y estas, a su vez, podrían ser transmitidas a los seres humanos a través de exposiciones ambientales como aire, agua y suelo. (Levy S.B., 1976, p. 583-588), (Noyes, N. R., 2016). Las bacterias no patógenas que portan genes de resistencia a antimicrobianos podrían suponer un

riesgo para la salud pública si llegan a establecerse dentro del microbioma del huésped humano, aumentando la probabilidad de transferencia horizontal de genes entre bacterias portadoras y patógenos causantes de graves infecciones. (Forsberg, K. J., 2012, p. 1107-1111), (Rolain, J. M., 2013).

A partir de esta problemática, el presente trabajo tiene el objetivo de evaluar la presencia de algunos genes de resistencia prohibidos en la producción animal de Brasil, en el ADN de las bacterias que hacen parte de la microbiota de diferentes porciones del tracto gastrointestinal de novillos lecheros alimentados con extracto de orégano como alternativa al uso de aditivos antimicrobianos, esto permite corroborar la existencia de otras vías de diseminación de resistencia diferentes a la alimentación, alertando a los sistemas de producción animal. Además de esto, este estudio permite analizar la influencia del extracto de orégano sobre el patrón de genes de resistencia encontrado en las diferentes porciones gastrointestinales.

## 2 | MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron recolectadas muestras provenientes de diferentes porciones del tracto gastrointestinal (Rumen, yeyuno, ciego y colon) de un grupo de novillos alimentados con un suplemento de extracto de orégano como alternativa al uso de aditivos antimicrobianos.

Se realizó el mismo procedimiento en un grupo control sin suplemento para evaluar la influencia del extracto sobre el patrón de resistencia encontrado en el grupo suplementado con extracto de orégano en su dieta. Es importante resaltar que no fue suministrado ningún tipo de aditivo antimicrobiano a los animales en estudio.

### **Antecedentes**

Se criaron 10 novillos, machos, de raza holandesa, bajo condiciones controladas, en corrales individuales, con piso forrado con heno. Durante sus primeros días de vida, estos animales consumieron calostro de calidad y posteriormente fueron alimentados con leche en polvo, concentrado y heno hasta completar 60 días desde su nacimiento. La dosis inicial del suplemento fue de 60 mg/kg de peso vivo de extracto de orégano (OREGO-STIM®, AdvetNutrição Animal, Bedfordshire, Inglaterra) y esta recibió un ajuste a cada dos semanas.

### **Extracción de ADN total**

El ADN total fue extraído a partir de 8 muestras obtenidas de un pool de novillos para cada uno de los diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal. Fueron transferidos 200mg de cada muestra a un tubo *ependorf* de 2 mL previamente identificados, en seguida se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y este paso se repitió con algunas muestras hasta obtener la formación de una cantidad suficiente

de pellet en el tubo. Este procedimiento fue realizado siguiendo el protocolo establecido en el *E.Z.N.A.®Stool DNA Kit* de acuerdo con las instrucciones de su fabricante.

### Cuantificación de ADN

Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas a través del *fluorímetroQuibit® 2.0* (Invitrogen, California, USA), previamente calibrado. Posteriormente, las muestras de ADN se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de aproximadamente -20°C.

### Detección de Genes de Resistencia

Las amplificaciones de AND fueron realizadas en un volumen de reacción de 25µL utilizando un “mix” de agua ultrapura, Buffer, Taq ADN polimerasa recombinante (5 U/µL) MgCl<sub>2</sub> [50 mM], dNTPs [10 mM], primers forward y reverse [10 µM], esta reacción se llevó a cabo siguiendo las etapas descritas en la table 1.

<b>Genes de resistencia</b>	<b>Desnaturalización Inicial</b>	<b>Paso 1</b>	<b>Paso 2</b>	<b>Paso 3</b>	<b>Extensión Final</b>	<b>Número de Ciclos</b>	<b>Referencia</b>
<b>Tet M</b>	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	35	Aarestrup (2000)
	5min	1min	1min	50seg	50seg		
<b>Tet W</b>	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	35	Aminov et al. (2001)
	5min	1min	1min	1min	5min		
<b>Tet L</b>	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	35	Frazzon et al. (2010)
	5min	1min	1min	1min	5min		
<b>Bla Tem</b>	95°C	95°C	48°C	72°C	72°C	40	Carlson et al. (1999)
	5min	1min	30seg	30seg	5min		
<b>Mrs C</b>	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	35	Werner et al. (2001)
	5min	1min	1min	1min	5min		
<b>Erm B</b>	93°C	93°C	52°C	72°C	72°C	35	Sutcliffe et al. (1996)
	3min	1min	1min	1min	5min		

**Tabla 1.** Condiciones de PCR convencional utilizadas en la detección de genes de resistencia

Para evaluar la presencia de los genes de resistencia se amplificó la región de interés utilizando cebadores específicos bajo las condiciones requeridas para cada gen de resistencia. (Tabla 2).

Los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa

coloreado con Bromuro de etidio y visualizados utilizando luz ultravioleta.

<i>Genes de resistencia</i>	<i>Secuencia de cebadores</i> 5' - 3'	<i>Pb*</i>	<i>Referencia</i>
<b>Tet M</b>	GTAAATAGTGTTCCTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	656	Aarestrup (2000)
<b>Tet W</b>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGCGTATCCACAATGTTAAC	167	Aminov et al. (2001)
<b>Tet L</b>	ACTCGTAATGGTTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTTAACACG	628	Frazzon et al. (2010)
<b>Bla Tem</b>	GCACGAGTGGGTTACATCGA GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	311	Carlson et al. (1999)
<b>Mrs C</b>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG GTAAACAAAATCGTTCCCG	343	Werner et al. (2001)
<b>Erm B</b>	GAAAAGGTACTIONCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	Sutcliffe et al. (1996)

\*Pb (Pares de base): Tamaño del Fragmento amplificado.

**Tabla 2.** Secuencias Iniciadoras utilizados en las reacciones de PCR

### 3 | RESULTADOS

En el tracto intestinal (Yeyuno, ciego y colon) fueron detectados cuatro de los seis genes evaluados en la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal de los novillos con 60 días de vida.

Todas las muestras intestinales exhibieron resistencia a Tetraciclinas, Betalactámicos y Eritromicina como representante de la familia de los macrólidos, esta se evidencia por la presencia de los genes *Tet(W)*, *Tet(M)*, *BlaTem* y *Erm(B)*, sin ser suministrados como fármacos aditivos en su alimentación.

En el tracto gástrico fueron localizados tres genes, *Tet(W)*, *BlaTem* y *Erm(B)* también encontrados en los demás compartimentos evaluados, a excepción del gen *Tet(M)* que no fue detectado en el rumen, entre tanto, se presentó en las porciones intestinales correspondientes al yeyuno, colon y ciego. Los genes *Tet(L)* y *Mrs(C)* no fueron localizados en el microbioma gastrointestinal de los novillos.

El patrón de resistencia para los genes evaluados en la microbiota de las porciones del tracto gastrointestinal de los novillos fue idéntico para el grupo suplementado con



extracto de orégano respecto al grupo control. (Figura 1).

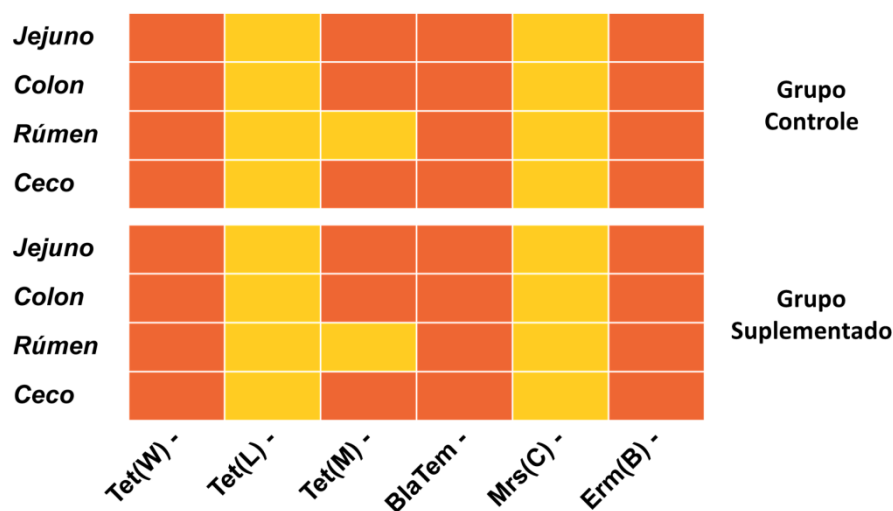


Figura 1. Patrón de Resistencia del grupo control y grupo de novillos cuya alimentación fue suplementada con extracto de orégano. Amarillo (Ausencia) y naranja (Presencia)

#### 4 | DISCUSIÓN

El uso de Tetraciclinas y Betalactámicos en la producción animal, está prohibido desde el año 2009, (MAPA, 2009) y de Eritromicina a partir del año 2012 en Brasil, (MAPA, 2012) pues se han encontrado trazas de estos en productos alimenticios de origen animal como leche y huevos. (Pacheco-Silva E., 2014, p. 111-122). Estos fármacos antimicrobianos no fueron suministrados en la dieta de los individuos de este estudio con el fin de eliminar la variable alimentación como vía de ingreso de esta resistencia. Entre tanto, a través de los resultados positivos de los genes de resistencia *Tet(W)*, *Tet(M)*, *BlaTem* y *Erm(B)* se infiere que las bacterias presentes en el microbioma de los novillos pueden ser adquiridas a través de una vía de diseminación diferente a la alimentación.

Este estudio utilizó muestras agrupadas para explorar la variación de la resistencia en diferentes compartimentos gastrointestinales, puesto que estos presentan diferentes condiciones y pueden favorecer la proliferación de diferentes géneros microbianos, como el género *Prevotella sp.* que es el miembro del filo Bacteroidetes más abundante encontrado en el rumen, y encontrado en menor proporción en ciego y colon. (Thomas, M., 2017).

El gen *Tet(M)* se presentó en todas las muestras intestinales, entre tanto, no fue detectado en el rumen. En diversos estudios se ha comprobado que el pH del rumen se reduce debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta, particularmente lactato. (Nagaraja, T. G., 1998, p. 287-298).

Se analizaron tres variantes distintas de genes de resistencia a las Tetraciclinas *Tet(W)*, *Tet(M)* y *Tet(L)*, siendo este último ausente en el tracto gastrointestinal de los novillos, una razón principal podría ser el mecanismo de resistencia utilizado por las

bacterias de esta microbiota, puesto que, el gen *Tet(L)* codifica para proteínas asociadas a la membrana bacteriana, que tienen como función expulsar las tetraciclinas de la célula, disminuyendo la concentración intracelular del antibiótico, mientras que los genes *Tet(W)* y *Tet(M)* codifican para proteínas que generan cambios en el ribosoma, como mecanismo de protección, impidiendo la adhesión del antibiótico. (Jara, M., 2007).

Como alternativa al uso de aditivos antimicrobianos, se optó por el suministro de extracto de orégano, el cual no influyó en el patrón de resistencia generado a partir de los genes evaluados en este estudio, esto se evidencia, al comparar los genes encontrados en el grupo suplementado y el grupo control. Es de gran interés la evaluación del resistoma completo presentado en estos animales, para tener un resultado más contundente sobre la influencia de este extracto como posible suplente de los antimicrobianos.

La investigación en esta área se ha visto limitada por los desafíos que acarrea la dificultad de obtener muestras representativas de cada novillo de forma individual. Entre los desafíos específicos se incluye la detección de pequeñas secuencias, como lo son los genes de resistencia, dentro de un género bacteriano presente disperso entre un ADN total.

Hasta donde se tiene conocimiento, ningún estudio ha rastreado específicamente la resistencia a antimicrobianos en ganado suplementado con extractos naturales en vez de aditivos antimicrobianos y compararlos con genes presentes en entornos ambientales. La escasez de evidencia limita la posibilidad de desarrollar políticas efectivas relacionadas con la inspección de efluentes ambientales ganaderos, igual que la restricción de antimicrobianos en el ganado, (Landers, T. F., 1974, p.4-22) con el objetivo de proteger la salud pública.

A medida que transcurren los años, se agotan las estrategias contra microorganismos resistentes, por lo tanto, el riesgo de la resistencia antimicrobiana debe ser evaluado y dado a conocer (Martínez, J., 2015, p. 116-123) para buscar estrategias de inspección que eviten la propagación de dichos genes.

## 5 | CONCLUSIONES

La comunidad científica requiere desarrollar una mejor comprensión del riesgo de los diferentes genes de resistencia.

Este estudio demuestra que es importante alertar a los sistemas de producción animal respecto a la necesidad de una inspección adecuada y control de calidad en sistemas de producción, no solamente de los productos de origen animal, sino también en residuos ambientales durante y después de los procesos para minimizar la probabilidad de transmisión horizontal entre bacterias de la microbiota con genes de resistencia adquiridos del entorno y bacterias patógenas que puedan causar enfermedades de gran importancia para la salud pública.

## 6 | PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta el riesgo potencial que puede representar las exposiciones ambientales como mecanismo de diseminación de resistencia, se hace necesario investigar el entorno de las diferentes regiones geográficas donde existen corrales de ganado, puesto que, habiendo una conectividad ambiental, esta podría extenderse a los hábitats humanos a través de escorrentías de aguas residuales, aplicación de estiércol en tierras de cultivo y partículas en suspensión por el viento. Esta investigación debe tener en cuenta diversas fuentes de contaminación con bacterias resistentes como muestras del entorno en la cría de animales y otros efluentes ambientales, incluso realizar una comparación del microbioma a lo largo de diversas generaciones para evaluar si estos genes pueden ser transmitidos verticalmente.

## REFERENCIAS

Aarestrup, F. M. *et al.* **Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000.

Aminov, R. I.; Garrigues-Jeanjean, N.; Mackie, R. I. **Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins.** *Applied and environmental microbiology.* 2001.

Carlson, S. A. *et al.* **Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR.** *Mol Cell Probes.* 1999.

Davies, J.; Davies, D. **Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and molecular biology reviews.** *MMBR.* 2010.

Forsberg, K. J. *et al.* **The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens.** *Science (New York, N.Y.).* 2012.

Jara, M. **Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana.** *Avances en Ciencias Veterinarias.* 2007.

Landers, T. F. *et al.* **A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential.** *Public health reports.* 2012.

Levy S. B.; FitzGerald G. B.; Macone A. B. **Changes in Intestinal Flora of Farm Personnel after Introduction of a Tetracycline-Supplemented Feed on a Farm.** *New England Journal of Medicine.* 1976.

Martínez, J., Coque, T. & Baquero, F. **What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes.** *NatRevMicrobiol.* 2015.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos (MAPA). **Instrução Normativa No 26**, publicada no DOU de 10/07/2009, Seção 1. Brasil, 09 de julho de 2009.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos (MAPA). **Instrução Normativa No 14**, publicada no DOU

de 18/05/2012, Seção 1. Brasil, 17 de maio de 2012.

Nagaraja T. G.; Chengappa, M. M. **Liver abscesses in feedlot cattle: a review.** Journal of Animal Science. 1998.

Noyes, N. R. *et al.* **Resistome diversity in cattle and the environment decreases during beef production.** eLife, 5, e13195. 2016.

Pacheco-Silva, E.; Souza, J. R.; Caldas, E. D. **Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos.** Química Nova. 2014.

Rocha, Claudio; Reynolds, Nathanael D.; Simons, Mark P. **Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud.** Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2015.

Rolain J. M. **Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes.** Frontiers in microbiology. 2013.

Sutcliffe, J. *et al.* **Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 1996.

Thomas, M. *et al.* **Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle.** Scientific reports. 2017.

Werner, G.; Hildebrandt, B.; Witte, W. **The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001.

## OBTENÇÃO DE CELULASES MICROBIANAS: UMA BREVE REVISÃO

*Data de aceite: 01/06/2020*

*Data de submissão: 29/04/2020*

### **Tatielle Pereira Silva**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Química e  
Biotecnologia, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/3857886655819881>

### **Alexsandra Nascimento Ferreira**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Química e  
Biotecnologia, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/2304631709377574>

### **Cledson Barros de Souza**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Química e  
Biotecnologia, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/8206252182609269>

### **Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e  
Biologia Molecular, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/8548200518407877>

### **Marta Maria Oliveira dos Santos**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Química e  
Biotecnologia, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/5925280745485828>

### **Hugo Juarez Vieira Pereira**

Universidade Federal de Alagoas  
Programa de Pós Graduação em Química e  
Biotecnologia, Maceió – Alagoas  
<http://lattes.cnpq.br/3682743268696668>

**RESUMO:** As celulases são enzimas hidrolíticas do complexo celulolítico que clivam as ligações O-glicosídicas da celulose, sendo divididas em três grupos, de acordo com o seu local de ação no substrato celulósico: endoglucanases (EnG), que dão início a hidrólise e clivam ligações internas da fibra celulósica, na região amorfa; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Constituem uma grande proporção do grupo de enzimas coletivamente conhecidas como celulases, que estão entre as três enzimas mais vendidas em todo o mundo e têm aplicações em várias indústrias. São utilizadas para catalisar reações de vários processos em muitos setores industriais, como têxteis, papel, produtos farmacêuticos, alimentos e ração animal. Os custos para a produção de enzimas ainda é um impedimento, uma vez que, são macromoléculas de grande valor agregado, no entanto muitos estudos vêm sendo realizados

a fim de baratear os custos de produção, empregando técnicas tais como fermentação em estado sólido que utilizam resíduos agroindustriais como meio de cultura alternativo. Neste trabalho de revisão, pretendeu-se fornecer uma visão geral sobre as pesquisas que vêm sendo desenvolvidas para a obtenção, purificação e aplicação biotecnológica de celulases microbianas produzidas em meios de cultura de baixo custo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Endoglucanase. Exoglucanase.  $\beta$ -glicosidase. Purificação. Fermentação.

## OBTAINING MICROBIAL CELLULASES: A BRIEF REVIEW

**ABSTRACT:** Cellulases are hydrolytic enzymes of the cellulolytic complex that cleave the O-glycosidic bonds of cellulose, being divided into three groups, according to their site of action on the cellulosic substrate: endoglucanases (EnG), which initiate hydrolysis and cleave internal bonds cellulose fiber, in the amorphous region; exoglucanases (ExG), which act on the outer region of the cellulose; and  $\beta$ -glycosidases (BG), which hydrolyze glucose-soluble oligosaccharides. They constitute a large proportion of the group of enzymes collectively known as cellulases, which are among the three best-selling enzymes worldwide and have applications in various industries. They are used to catalyze reactions of various processes in many industrial sectors, such as textiles, paper, pharmaceuticals, food and animal feed. The costs for the production of enzymes is still an impediment, since they are macromolecules of great added value, however many studies have been carried out in order to lower production costs, employing techniques such as solid state fermentation that use residues agribusiness as an alternative culture medium. In this review work, it was intended to provide an overview of the research that has been developed for obtaining, purifying and biotechnological application of microbial cellulases produced in low-cost culture media.

**KEYWORDS:** Endoglucanase. Exoglucanase.  $\beta$ -glycosidase. Purification. Fermentation.

## 1 | INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante seus crescimentos em materiais celulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos, anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos (SUN e CHENG, 2002). São enzimas hidrolíticas que compõem o grupo das celulases as endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- $\beta$ -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) atuam de forma sinérgica na degradação da celulose.

Desempenha um papel fundamental na hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica da celulose, um componente dominante da parede celular das plantas. A produção de celulases é uma importante área de pesquisa. No mercado industrial, ocupa a terceira posição no ranking mundial, representando 20% do volume total de enzimas comercializadas (YOON

et al., 2014). Podem ser obtidas por distintas técnicas, tais como a fermentação submersa e fermentação em estado sólido (KASANA et al., 2008). Possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 2000).

Diante da importância desta temática, e ascensão do uso das celulases em diversos setores biotecnológicos e industriais, o presente trabalho teve como objetivo revisar a literatura acerca da obtenção de celulases microbianas, ressaltando suas principais características, as técnicas de fermentação utilizadas durante a sua produção, métodos de purificação e principais aplicações biotecnológicas.

## 2 | COMPLEXO CELULOLÍTICO

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas, constituída de polímero de glicoses ligadas por ligação do tipo  $\beta$ -1-4. E muitos microrganismos possuem a capacidade de degradar a celulose para obter energia para seu desenvolvimento, entre eles estão: as bactérias e os fungos sejam filamentosos aeróbios ou anaeróbios ou leveduras. Os microrganismos utilizam um complexo celulolítico constituído por três enzimas: endoglucanases,  $\beta$ -glicosidase e exoglucanases (WANG et al., 2014).

A hidrólise completa da biomassa celulolítica requer o sinergismo das três enzimas do complexo celulolítico: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). Estruturalmente, as enzimas possuem dois domínios separados, o primeiro um domínio de ligação à celulose (CBM) e o segundo um domínio catalítico proeminente (CD) contendo resíduos ativos que formam uma fenda ou bolsa catalítica. Ambos os domínios de proteína modular são conectados por uma região de ligação flexível, rica em treonina e serina, e o CBM contém cerca de 35 resíduos de aminoácidos. As enzimas celulolíticas agem sinergicamente para converter a celulose em glicose, as endoglucanases atuam em primeiro lugar, clivando a cadeia linear de celulose, atuando nas ligações  $\beta$ -1-4 internas, posteriormente, as exoglucanases atuam em resíduos expostos pela ação da endoglucanase e liberam a celobiose que é convertido em glicose livre pela  $\beta$ -glicosidase (AKRAM et al., 2018; WATANABE and TOKUDA, 2010).

### 2.1 Características das endoglucanases

É responsável por iniciar a hidrólise dos polímeros de glicose, atuam em regiões aleatórias da cadeia, liberando novas extremidades na cadeia de celulose, que são alvos das exoglucanases. As endoglucanases com propriedades importantes quanto ao pH ótimo e temperatura ótima variam de acordo com os microrganismos de origem. Microrganismos termófilos como: *Sporotrichum sp.*, *Thermoascus aurantiacus*, *Talaromyces emersonii*,

apresentam atividade ideal a 70 a 80°C. (Ishihara et al., 1998, Murray et al., 2001), mostrando excelência estabilidade térmica. Contudo, a maioria das endoglucanases apresentam temperaturas ótimas entre 50° a 70°C (Dashtban and Qin, 2009), a exemplo da endoglucanase isolado do *Botrytis ricini*, que apresentou temperatura ótima de 50°C. (SILVA et al., 2018).

As endoglucanases fúngicas tem suas maiores atividades em pH 4,0 a 6,0, pHs acima de 7 reduzem significativamente a atividade das endoglucanases (QIN et al., 2008). Estudos sugerem que alterações em alguns resíduos de aminoácidos que aumentam a cadeia lateral hidrofóbica da enzima, aumentem a estabilidade da enzima em pH alto (QIN et al., 2008).

## 2.2. Características das exoglucanases

Na hidrólise da celulose as exoglucanases atuam nos oligossacarídeos provenientes da ação das endoglucanases, agem nas extremidades das cadeias gerando celobiose, um dissacarídeo que será hidrolisado pela  $\beta$ -glicosidase. (HAN and CHEN, 2010). A temperatura ótima das exoglucanases difere das endoglucanases, as exoglucanases atuam com máxima atividade com temperatura em torno de 30°C, com o aumento da temperatura observa-se uma diminuição da atividade enzimática. (HANIF et al., 2004). Segundo Hanif et al., 2004, o pH ótimo das exoglucanases é entre o pH 6,0 e 7,0. Duas faixas acima do pH ótimo para as endoglucanases.

## 2.3 Características das $\beta$ -glicosidase

A última enzima do complexo enzimático a agir, atuando na hidrólise da celobiose, um dissacarídeo proveniente da ação das exoglucanases e gerando glicose livre. (SHASTRI, 2016). As  $\beta$ -glicosidases atuam clivando as ligações glicosídicas entre as moléculas de glicose.

A temperatura ótima para as  $\beta$ -glicosidase isoladas de fungos filamentosos variam entre 50° a 70°C, a exemplo da  $\beta$ -glicosidase isolada do *Penicillium sp* com atividade máxima entre 50° e 60°C.(ROSA et al., 2018). As maiores atividades das  $\beta$ -glicosidases em pH 4,0 a 5,0, em pH 6,0 a atividade enzimática cai significativamente. (SHASTRI, 2016). Como observado em  $\beta$ -glicosidase isoladas de *P. funiculosum*, (pH 4,8) (CASTRO et al., 2010), *P. citrinum* (pH 5,0) (DUTTA et al., 2008).

## 3 | OBTENÇÃO DE CELULASES MICROBIANAS

As celulases microbianas podem ser produzidas por bactérias, fungos e actinobactérias por estática e agitando o meio de cultura (MOHITE; PATIL, 2016). As duas principais estratégias para a produção de celulases por micro-organismos são a



fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS) (KASANA et al., 2008). A produção comercial de celulases realizadas por FES e FS contêm celulose em diferentes graus de pureza, ou como substratos lignocelulósicos brutos (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

A produção de celulase é possível tanto com o uso de fermentação submersa e de estado sólido. Existem muitas pesquisas sobre a produção microbiana de celulases utiliza tecnologia de fermentação submersa (FS) e o organismo amplamente estudado usado na produção de celulase é *T. reesei*. A fermentação submersa destaca-se por ser uma técnica favorável em muitos casos, sendo fácil de manusear e monitorar as variáveis. Essa técnica provou ser vantajoso em escala industrial por produzir muitas enzimas úteis. (CHAKRABORTY et al., 2019).

Já a fermentação em estado sólido (FES) para produção de celulases está rapidamente ganhando interesse como uma tecnologia econômica, pois desencadeia uma redução de dez vezes no custo comparando a FS, sendo que para produção industrial de enzimas também se aplica na tecnologia para produção de celulase. (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005). FES é uma técnica utilizada para produzir produtos de alto valor final sendo comum a utilização de resíduos agroindustriais e nutrientes (CHAKRABORTY et al., 2019).

Sendo assim comparando as duas técnicas podemos afirmar que FS é o método mais utilizado para a produção de enzimas, pois oferece vantagens como um biorreator bem desenvolvido, equipado com técnicas de monitoramento e controle; no entanto esse método tem rendimento moderado, com alto custo e gerar grandes quantidades de água como resíduo, já a FES supera as desvantagens por obter vantagens econômicas em que requer substrato de baixo custo, como resíduos lignocelulósicos e fornece uma plataforma para melhor interação de microrganismos e um substrato que resulta em maior concentração enzimática (ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

Utilizando as duas técnicas existem uma grande variedade de microrganismos (várias espécies de fungos e bactérias) que foram aplicados até a fonte de celulases microbianas tabela 1.

Microrganismos	Métodos
<i>Aspergillus niger</i> A 20	FS
<i>A. niger</i> NRRL3	FES
<i>Bacillus pumilus</i>	FS
<i>Bacillus sp</i> KSM N252	FS
<i>B. subtilis</i>	FES
<i>B. subtilis</i>	FES
<i>Chaetomium thermophilium</i> CT2	FS
<i>Melnocarpus albomyces</i> Mixed culture: <i>T. reesei</i> ,	FS
<i>A. niger</i>	FES

<i>Mucor circinelloidens</i>	FS
<i>Neurospora crassa</i>	FS
<i>Penicillium decumbans</i>	FES
<i>P. occitanis</i>	FS
<i>P. janthinellum</i>	FS
<i>Phaenerocheate chrysosporium</i>	FS
<i>Rhodothermus marinus</i>	FS
<i>Streptomyces sp T3-1</i>	FS
<i>S. drodowiczii</i>	FS
<i>Thermoascus auranticus</i>	FES
<i>Thermotoga marítima</i>	FS
<i>T. reesei</i>	FS
<i>T. reesei RUT C30</i>	FS
<i>T. reesei RUT C30</i>	FS
<i>T. reesei ZU 02</i>	FES
<i>T. reesei ZU-02</i>	FS
<i>T. viridae</i>	FS

**Tabela 1.** Produção de celulase – Métodos e microrganismos

Fonte: Adaptado por Sukumaran et.al

## 4 | PURIFICAÇÃO

Sabe-se que o interesse por processos de purificação de biomoléculas está intimamente ligado ao desenvolvimento da biotecnologia e às demandas industriais de diferentes indústrias, tais como, alimentos, farmacêutica e química. Os processos de purificação são dados por etapas e isso por sua vez ao longo dos anos vem sendo discutidos por vários pesquisadores. Silva et al. (2018) purificaram uma endoglucanase halotolerante de *Botrytis ricini* URM 5627 em duas etapas, fracionamento salino com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Sephacryl S-100 (60x0,5 cm), pré-equilibrada com tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5), com recuperação final de 48,22%, a enzima apresentou peso molecular de 39 kDa. Celulases de *Pleurotus ostreatus* e *Cellulomonas uda* NCIM 2353 também foram purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho, usando colunas Sephadex G-100 (Okereke et al. 2017; Swathy et al. 2019).

Mudasir et al. (2019) purificaram uma celulase de *Bacillus tequilensis* G9 em quatro etapas de purificação, precipitação com sulfato de amônio, precipitação com acetona, diálise e cromatografia de troca iônica usando uma coluna dietilaminoetil (DEAE) - celulose (25x2 cm) equilibrada com tampão fosfato salino (20 mM, pH 7,4), as frações foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0,1 - 0,5M), com rendimento final de 10% a enzima apresentou 43 kDa de peso molecular. A cromatografia de troca iônica ainda foi usada por Mohapatra et al. (2018) e Prajapati et al. (2018) para purificar celulase de *Aspergillus fumigatus* (CWSF-7) e *Aspergillus tubingensis*, utilizando as colunas Sepharose G100 e

DEAE celulose-52, respectivamente.

Liu et al. (2019) purificaram uma celulase de *Bacillus velezensis* A4 por sistema aquoso de bifásico (SAB) usando metodologia de superfície de resposta. Observaram que as variáveis peso molecular do polietilenoglicol (PEG), a concentração do PEG e o pH afetam significativamente a taxa de recuperação e o fator de purificação. A recuperação máxima da enzima foi 67,8% e o fator de purificação 1,14, encontrados nas condições de PEG 4000 (20,75%, p/p),  $K_2HPO_4$  (8,5%, p/p), pH 8,5. O peso molecular da celulase foi 35 kDa. Ho et al. (2017) também purificaram uma carboximetil celulase (CMCase) de *Bacillus subtilis* por SAB de PEG/citrato de sódio.

Bernardes et al. (2019) purificaram uma celulase clonada, por cromatografia de afinidade metálica. Usaram uma coluna His-trap HP equilibrada com tampão A (TRIS 20mM, pH 7,5, NaCl 300mM, glicerol 5%, fluoreto de fenilmetanossulfonil 1mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 4,3M), as eluições de proteínas foram realizadas com um gradiente de imidazol usando o tampão B (TRIS 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 300 mM, glicerol 5% e  $\beta$ -mercaptoetanol 4,3 M). Por fim, utilizaram uma cromatografia de gel filtração em sistema FPLC, conectado a uma coluna Superdex 75. Além disso, Maleki et al. (2020) purificaram duas celulases clonadas por cromatografia de afinidade utilizando o Kit Ni-NTA Fast Start.

## 5 | APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

As celulases possuem um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregadas em diferentes indústrias. No refino e na modelagem da polpa de celulose, se reduz de 20-40% do gasto de energia e se produzem menos detritos sólidos quando são utilizadas celulases, além de facilitar a remoção de pigmentos da polpa e do papel, além de auxiliar na secagem da celulose sem comprometer a resistência e a clareza do mesmo, podendo até melhorar esses processos, diminuindo ou eliminando o uso de bases nos processos de fabricação e prevenindo amarelamento, como documentado para as celulases dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp.* (KUHAD, GUPTA et al., 2011; PERE et al., 2001; BHAT, 2000; MAI; EFRATI et al., 2013). Celulases ativas em pH ácido são mais eficientes no bioprocessamento de celulose que aquelas básicas ou neutras (BHAT, 2000). Celulases podem ser usadas na produção de papel higiênico, papel toalha, papelão e na remoção de papel aderido ( HSU & LAKHANI, 2002; SHARYO et al., 2002; ZHANG et al., 2013; LIU & HU, 2012).

O uso de celulases na fabricação de jeans apresenta vantagens sobre o processo tradicional de polimento como maior eficiência do maquinário, menor danificação das fibras, menor impacto ambiental e menos trabalho manual (KUHAD, GUPTA & SINGH, 2011). Celulases também facilitam o processamento de tecidos celulósicos amalgamando ou não com fibra sintética, removendo imperfeições na superfície dos tecidos, sujidades

presas entre as fibras, aumentando brilho e maciez (KUHAD, GUPTA & SINGH, 2011; SHARMA et al., 2016). Celulases dos fungos *Aspergillus Niger* e *Trichoderma reesei* já foram usadas no processamento de tecidos de algodão e daqueles compostos por algodão e poliéster respectivamente (NOREEN et al., 2014), bem como na remoção de partículas indesejas na fabricação de lã bruta, substituindo o uso de ácido sulfúrico, que é corrosivo, perigoso e poluente (SHARMA et al., 2016; SHAH, 2013). Um complexo com atividade celulolítica isolado de fungo do gênero *Neocallimastix* foi aplicado à fabricação de pão, diminuindo esfarelamento, tornando-o mais macio e de fácil mastigação (YURDUGUL et al., 2012).

Usando digestão anaeróbica e fermentação fúngica aeróbica, foi possível, através da ação combinada de celulases e amilases sobre palha de milho e estrume, obter biodiesel com grade eficácia de maneira sustentável (ZHONG et al., 2015). São usados resíduos vegetais tratados com enzimas celulósicas para enriquecer o solo, diminuindo utilização de fertilizantes minerais (TEJADA et al., 2008; ESCOBAR & HUE, 2008). Resíduos da agroindústria, geralmente sem valor comercial, são usados para fins importantes, como por exemplo, a obtenção de enzimas, açúcares, biocombustíveis e fontes para fermentação de microrganismos (KUHAD, GUPTA & SINGH, 2011; MILALA et al., 2005; ABU et al., 2000).

As celulases se mostraram capazes de facilitar a obtenção com grande rendimento de polifenóis com atividade antioxidante, servindo como carreadores de radicais livres, combatendo processos relacionados a diferentes doenças (HUANG et al., 2008; BHANJA, KUMARI & BANERJEE, 2009; DO et al., 2009; SHARMA et al., 2016). Celulases podem ser usadas na extração de carotenoides de vegetais para utilização como corantes, que são naturais e que possuem propriedades benéficas para a saúde (SHARMA et al., 2016). A indústria também já desenvolve suplementos alimentares contendo celulase, para combater algumas desordens metabólicas (KARMAKAR et al., 2011). O consumo de diversos alimentos leva à ingestão de fibra não digerível pelo ser humano, fibras que podem servir de suporte para bactérias no intestino (SHARMA et al., 2016).

## 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme observado nessa revisão de literatura, vários trabalhos abordam o grande interesse na obtenção e utilização das celulases em aplicações industriais bem como biotecnológicas, tais como, indústrias alimentícias, têxtil, ração animal, farmacêuticos, produtos químicos, produção de biocombustíveis, entre outros. Mesmo em meio aos obstáculos, que estão intimamente ligados aos custos na produção, bem como na possível reutilização desse catalisador biológico muitos esforços pela redução de custos na produção de enzimas tem proporcionado o aumento das pesquisas na sua produção através da utilização de cepas microbianas associadas às técnicas de fermentação. No

que diz respeito a utilização de técnicas de purificação de celulases, muitos estudos vem sendo realizados para o desenvolvimento e ampliação de metodologias que apresentem baixo custo, alto rendimento e maior pureza.

Diante disso vê-se a importância de abordar e revisar essa temática, uma vez que muitos esforços vêm sendo realizados a fim de ampliar e fomentar essas linhas de pesquisa que tanto cresce no âmbito científico e biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- Abu et al., **Cellulase production from sorghum bran by *Aspergillus niger* SL:1: an assessment of pretreatment methods**, Commercialization and Food Security (ICBCFS '00), pp. 153–159, Abuja, Nigeria, 2000.
- AKRAM, F. HAQ, I. UL. IMRAM, W. MUKHTAR, H. **Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review**. Renewable Energy 122 (2018) 255-238.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. **Bioreactors in solid state fermentation technology : Design , applications and engineering aspects**. Journal of Biotechnology, v. 269, n. January, p. 16–34, 2018.
- BERNARDES, A., PELLEGRINI, V.O.A., CURTOLO, F., CAMILO, C.M., MELLO, B.L., JOHNS, M.A., SCOTT, J.L., GUIMARAES, F.E.C., POLIKARPOV, I. **Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate**. Carbohydrate Polymers, v.211, p.57-68, 2019.
- BHAT, MK14538100. **Cellulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnology advances, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BHANJA, TAPATI; KUMARI, ANJALI; BANERJEE, RINTU. **Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi**. Bioresource Technology, v. 100, n. 11, p. 2861-2866, 2009.
- Castro, M. A. Carvalho, A. L. A. Leite, S. G. F. Pereira Jr. N. **Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis**. J Ind Microbiol Biotechnol (2010) 37: 151-158
- CHAKRABORTY, S.; YADAV, G.; SAINI, J. K.; KUHAD, R. C. **Comparative Study of Cellulase Production Using Submerged and Solid-State Fermentation**. Springer, Cham n. abril, p. 99-113, 2019.
- DAR, M. A., PAWAR, K. D., RAJPUT, B. P., RAHI, P., PANDIT, R. S. **Purification of a cellulase from cellulolytic gut bacterium, *Bacillus tequilensis* G9 and its evaluation for valorization of agro-wastes into added value byproducts**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.20, p.101219, 2019.
- DASHTBAN, M. SCHRAFT, H. QIN, W. **Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues: Opportunities e Perspectives**. Int. J. Biol. Sci. 2009, 5.
- DO, YOUN-KYUNG et al. **Enhancement of polyphenol bio-activities by enzyme reaction**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 56, n. 2-3, p. 173-178, 2009.
- DUTTA, T. SAHOO, R. SENGUPTA, R. RAY, S. S. BHATTACHARJEE, S. G. **Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: Production and characterization**. J. Ind Microbiol Biotechnol (2008) 35: 275-282

HAN, Y. CHEN, H. **Biochemical characterization of a maize stove  $\beta$ -exoglucanase and its use in lignocellulose conversion.** *Bioresource Technology* 101 (2010) 6111-6117.

HANIF, A. YASMEEN, A. RAJOKA, M. I. **Induction , production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*.** *Bioresource Technology* 94 (2004) 311-319.

HO, S. L., LAN, J. C. W., TAN, J. S., YIM, H. S., NG, H. S. **Aqueous biphasic system for the partial purification of *Bacillus subtilis* carboxymethyl cellulase.** *Process Biochemistry*, v.58, p.276-281, 2017.

HSU, JAY C.; LAKHANI, NAUMAN N. **Method of making absorbent tissue from recycled waste paper.** U.S. Patent n. 6,413,363, 2 jul. 2002.

HUANG, D. et al. **The health-promoting function and the application of konjac mannooligosaccharides (KMOS).** *Food Science and Technology (China)*, v. 10, n. 10, p. 159-161, 2007.

KARMAKAR, M. et al. **Current trends in research and application of microbial cellulases.** *Res J Microbiol*, v. 6, n. 1, p. 41-53, 2011.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. **A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine.** *Current Microbiology*, v. 57 (5), n. Setembro, p. 503-507, 2008.

KUHAD, RAMESH CHANDER; GUPTA, RISHI; SINGH, AJAY. **Microbial cellulases and their industrial applications.** *Enzyme research*, v. 2011, 2011.

LIU, JUN; HU, HUIREN. **The role of cellulose binding domains in the adsorption of cellulases onto fibers and its effect on the enzymatic beating of bleached kraft pulp.** *BioResources*, v. 7, n. 1, p. 0878-0892, 2012.

LIU, Y., GUO, H., GU, J., QIN, W. **Optimize purification of a cellulase from *Bacillus velezensis* A4 by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology.** *Process Biochemistry*, v.87, p.196-203, 2019.

MAI, C.; KÜES, U.; MILITZ, H. **Biotechnology in the wood industry.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 63, n. 5, p. 477-494, 2004.

MALEKI, M., SHAHRAKI, M. F., KAVOUSI, K., ARIAEEENEJAD, S., SALEKDEH, G. H. **A novel thermostable cellulase cocktail enhances lignocellulosic bioconversion and biorefining in a broad range of pH.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 154. P. 349-360, 2020.

MILALA, M. A. et al. **Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*.** *Research journal of agriculture and biological sciences*, v. 1, n. 4, p. 325-328, 2005.

MOHAPATRA, S., PADHY, S., MOHAPATRA, P. K. D., THATOI, H. N. **Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*.** *Bioresource Technology*. v. 253, p.262-272, 2018.

MOHITE, B. V; PATIL, S. V. **Impact of Microbial Cellulases on Microbial Cellulose Biotechnology. *Novos e futuros*** *Desenvolvimentos em Biotecnologia Microbiana e Bioengenharia*. n. Agosto, p. 31-40, 2016.

NOREEN, HAFIZA et al. **Optimization of bio-polishing of polyester/cotton blended fabrics with cellulases prepared from *Aspergillus niger*.** 2014.

O.E OKEREKE, H.O AKANYA, E.C EGWIM. **Purification and characterization of an acidophilic cellulase from *Pleurotus ostreatus* and its potential for agrowastes valorization.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.12, p.253-259, 2017.

- PERE, Jaakko et al. **Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn.** Journal of biotechnology, v. 89, n. 2-3, p. 247-255, 2001.
- PRAJAPATI, B. P., SURYAWANSHI, R. K., AGRAWAL, S., GHOSH, M., KANGO, N. **Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues.** Bioresource Technology. v. 250, p.733-740, 2018.
- QIN, Y. WEI, X. SONG, X. QU, Y. **Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum.** Journal of Biotechnolog 135 (2008) 190-195.
- ROSA, P. S. S. SOUZA, A. L. ROQUE, R. A. ANDRADE, E. V. FILHO, S. A. MOTTA, A. J. SILVA, C. G. N. **Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region.** Electronic Journal of Biotchnology 31 (2018) 84-92.
- SHARMA, Amita et al. **Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.
- SHARYO, Masaki et al. **Method of making sanitary paper from chemical pulp using a single component cellulase that does not contain cellulose-building domain.** U.S. Patent n. 6,468,391, 22 out. 2002.
- SHASTRI, Y. FENILA, F. **Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** Resource-Efficient Technologies 2 (2016) S96-S104.
- SILVA, T. P. ALBUQUERQUE, F. S. SANTOS, C. W. V. FRANCO, M. CAETANO, L. C. PEREIRA, H. J. V. **Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627.** Bioresource Technology 270 (2018) 263-269.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. **Microbial cellulases Production , applications and challenges.** Journal of Scientific & Industrial Research, v. 64, n. November, p. 832–844, 2005.
- SUN, Y.; CHENG, J. **Hidrolisis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource Technology, v. 83, p.1-11, 2002.
- SWATHY, R., RAMBABU, K., BANAT, F., HO, S. H., CHU, D. T., SHOW, P. L., **Production and optimization of high grade cellulase from waste date seeds by *Cellulomonas uda* NCIM 2353 for biohydrogen production.** International Journal of Hydrogen Energy, 2019.
- YON,L.W.;ANG,N.T.;NGOH,G.C.;**CHUA,M.S.A.Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.** Biomass and Bioenergy,v.67,p.319-338.
- YURDUGUL, SEYHUN et al. **The influence of a cellulase bearing enzyme complex from anaerobic fungi on bread staling.** Rom Agric Res, v. 29, p. 2067-5720, 2012.
- WANG, C.H. CHEN, Y.C. HSEU, R.S. **Purification and characterization of a cellulolytic multienzyme complex produced by *Neocallimastix patriciarum* J11.** Biochemical and Biophysical Research Communications 451 (2014) 190-195.
- WATANABE, H. TOKUDA, G. **Cellulolytic Systems in Insects.** Annu. Rev. Entomol. 2010. 55: 609-32.
- ZHANG, ZHENG-JIAN et al. **The beatability-aiding effect of *Aspergillus niger* crude cellulase on bleached simao pine kraft pulp and its mechanism of action.** BioResources, v. 8, n. 4, p. 5861-5870, 2013.
- ZHONG, YUAN et al. **A self-sustaining advanced lignocellulosic biofuel production by integration of anaerobic digestion and aerobic fungal fermentation.** Bioresource technology, v. 179, p. 173-179, 2015.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO** - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com



## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Agentes de Controle 84  
Alcaloides 3, 7, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20  
Álcool Gel 83, 84, 85, 88, 89, 90  
*Allium Cepa* 18, 19, 21, 25, 29, 30, 31, 32, 33  
antibióticos 16, 92, 99  
Antibióticos 92  
Antigenicity 58  
Antimicrobial Subinhibitory Concentrations. 67  
Antimicrobiano 1, 2, 6, 9, 12, 13, 83, 88, 89, 93  
Antissepsia 83, 84, 89  
Artemia Salina 18, 19, 21, 24, 26, 31, 33, 34

### B

*Bacteroides Fragilis* 66, 67, 68, 73, 74, 81, 82  
Bioativos 3, 18, 19, 20, 29, 31  
Bovinos 92

### C

*Corynebacterium Pseudotuberculosis* 57, 58, 59, 63, 64  
Criptococose 35, 48, 49, 50, 52, 53  
Cryptococcus Neoformans 35, 36, 40, 42, 53, 54, 55, 56  
Cytokines 58, 59, 60, 62, 63, 64

### E

Endoglucanase 101, 102, 103, 105, 110  
Exoglucanase 101, 109  
Extrato Orgânico 12

### F

Fermentação 101, 102, 104, 107  
Fitoquímica 1, 4, 7, 10, 12, 14, 15, 17

### J

Jatobá 1, 2, 3, 4, 7, 9

## M

Microbiota 81, 91, 92, 93, 95, 97

Microrganismos 7, 2, 14, 43, 44, 47, 83, 84, 85, 88, 89, 101, 102, 104, 105, 107

*Mycobacterium Tuberculosis* 57, 58, 64

## P

Pathogenicity 35, 58, 66, 67, 68, 69, 73, 76, 77, 78, 80

Plantas Aquáticas 19, 33

Plantas Medicinais 2, 3, 9, 10, 11, 17, 20, 21, 30, 31

Purificação 101, 102, 105, 106, 108

## R

Resistência 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99

## S

*Staphylococcus Aureus* 1, 2, 10, 11, 14

## T

Toxicidade 12, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 51, 52

Tracto Gastrointestinal 91, 92, 93, 95, 96

Tratamento 3, 4, 9, 13, 18, 20, 21, 25, 26, 30, 35, 36, 48, 50, 52, 67, 113

Tuberculosis 19, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 113

## V

Virulência 9, 35, 36, 38, 39, 43, 44, 46, 47, 48, 113

 **Atena**  
Editora

**2 0 2 0**