

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ALCOÓLICO DE *Spirulina platensis* FRENTE AO *Aspergillus fumigatus*.

Anny M. Fujimoto¹ Maria Angélica T. Fracassi²

1. Estudante da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC) - Curso Técnico de Química
2. Graduada em Ciências Biológicas, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e professora do Curso Técnico em Química na FETLSVC/Orientador.

Resumo

O presente projeto procura saber se é possível que a cianobactéria *Spirulina platensis* tenha atividade antifúngica frente ao *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus* são fungos normalmente presentes em domicílios, alimentos, solos e piscinas. E são os principais causadores da aspergilose pulmonar, a qual é uma condição infecciosa e não contagiosa. A doença normalmente é considerada grave quando atinge pacientes com imunodeficiência e portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Foram usados os métodos da disco difusão em ágar e microdiluição em caldo, com o objetivo de encontrar a concentração inibitória mínima que possui ação antifúngica. Para que possa ser feita uma comparação, foram utilizados discos de papel filtro com álcool etílico como controle negativo na disco difusão em ágar. Além de poços de controle na microdiluição em caldo. Baseando-se em testes realizados, o extrato alcoólico da *spirulina* não apresenta atividade antifúngica contra o *Aspergillus fumigatus*.

Autorização legal: CESP - cód. 10013

Palavras-chave: Fungos; microbiologia; cianobactéria.

Apoio financeiro: MOSTRATEC

Trabalho selecionado para a JNIC: MOSTRATEC

Introdução

Cada vez mais ao longo dos anos, vem crescendo a necessidade de explorar novos recursos para aplicações biotecnológicas. A *Spirulina platensis* ficou mundialmente conhecida como uma microalga, mas na verdade ela é uma cianobactéria, e não pode ser classificada como uma alga por ser cultivada em ambientes de água doce, e não marítimo.

Segundo Borba e Camargo (2019), a *Spirulina* realiza fotossíntese, convertendo nutrientes do meio material celular e liberando oxigênio. Sua principal característica morfológica é a disposição dos tricomas multicelulares cilíndricos em uma hélice esquerda aberta ao longo de todo o comprimento (TOMASELLI, 1997).

Segundo Revankar (2019):

A aspergilose é uma infecção oportunista causada por esporos inalados do fungo *Aspergillus* spp.; os esporos geram hifas e entram nos vasos sanguíneos como uma doença invasiva, causando necrose hemorrágica e infarto. Os sintomas podem ser os mesmos de asma, pneumonia, sinusite, ou doença sistêmica rapidamente progressiva.

O *Aspergillus fumigatus* é o principal causador da aspergilose, a qual é uma das infecções com índices de mortalidade mais elevados, chegando a atingir os 85% mesmo após a administração de terapêutica antifúngica. (BARBOSA, SILVA, RODRIGUES e RAMALHO, 2019).

Considerando o fato de que o *Aspergillus fumigatus* é o grande responsável pela aspergilose, além de ser um dos fungos mais comuns no mundo, e a *Spirulina* é utilizada em grande escala e de fácil acesso, conhecida por suas diversas propriedades, logo, podemos avaliar a eficácia da atividade antifúngica do extrato alcoólico da *Spirulina*. Pensando nisso, queremos saber se o extrato alcoólico de *Spirulina platensis* possui ação antifúngica frente a fungos do gênero *Aspergillus* spp.

Para isso, este projeto tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato alcoólico da *Spirulina platensis* frente a *Aspergillus* spp. Fazendo isso através de uma pesquisa sobre as propriedades antifúngicas da *Spirulina platensis*, além de estudar o efeito do *Aspergillus* spp. no organismo humano e sua relação com a aspergilose, realizar a extração do etanol a partir da *Spirulina platensis* e analisar a eficácia da atividade antifúngica do extrato alcoólico em relação ao *Aspergillus* spp.

Metodologia

Extrato alcoólico da *Spirulina platensis*

Para o extrato alcoólico, foram utilizadas amostras de *Spirulina* em pó adquiridas em uma farmácia de manipulação local. Foram pesadas 30 g de amostra. A amostra foi macerada e misturada com 150 ml de álcool etílico P.A., sendo submersa por 24 horas, e então filtrada. O resíduo da filtração foi submerso em 100 ml de álcool etílico P.A. por 48h. A amostra foi filtrada e misturada com o filtrado resultante da primeira filtração.

Crescimento e ativação do *Aspergillus* spp.

Para ativar a amostra de *A. fumigatus* disponível, utilizou-se o ágar batata-dextrose, conforme a norma M38-A (NCCLS, 2002). O fungo foi semeado utilizando um swab previamente submerso em solução salina a 0,85% e os mesmos foram levados para a estufa a 35°C por 7 dias. A suspensão de *Aspergillus fumigatus* foi semeada em uma placa de petri também contendo o ágar, e então incubada a 35°C para crescimento. Foi então preparada uma suspensão a partir dessa colônia. A qual foi transferida para um tubo de ensaio, e a partir disso, a camada superior foi transferida para um tubo de ensaio e homogeneizada em um vórtex por 15 segundos.

As densidades das suspensões são ajustadas utilizando um espectrofotômetro, obtendo uma densidade óptica (DO) entre 0,09 a 0,11. A amostra teve como resultado uma DO de 0,313. Sendo feita uma diluição de 1:3 da suspensão, resultando em uma DO de 0,134. Ao descontar o valor da prova em branco, temos 0,100. Sendo o valor encontrado dentro da faixa estabelecida pela norma.

Disco-difusão em ágar

Para a disco difusão em ágar, a suspensão preparada foi semeada em uma placa de petri, em meio ágar batata-dextrose, sendo feita em duplicata para cada uma das suspensões do *Aspergillus fumigatus*. Foram dispersados discos de papel filtro contendo o extrato alcoólico ou álcool etílico, em concentração de 20 µl/disco. A placa é incubada durante 3 a 5 dias a 37°C. Para a leitura dos resultados da disco-difusão em ágar, é observado o tamanho do diâmetro dos halos inibitórios formados, sendo possível classificar o microorganismo como não-suscetível, suscetível, intermediária ou resistente ao antifúngico.

Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo tem como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato que possui ação contra fungos do gênero *Aspergillus* spp. Para o início da inoculação dos poços, todos foram semeados com 100 µl do caldo YES, com exceção das linhas "G" e "H", que foram semeadas com 100 µl do extrato alcoólico. Após, cada um dos primeiros poços de cada linha foi semeado de acordo com o Quadro 1.

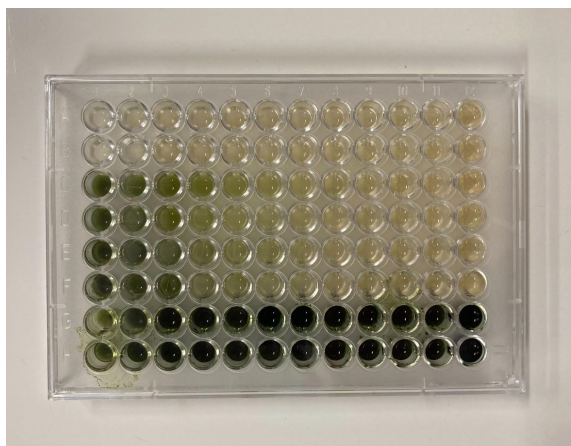
Quadro 1 - Quantidades adicionadas na microplaca

Linhas da placa x Matéria prima	Caldo YES	Inóculo	Extrato alcoólico de <i>Spirulina platensis</i>
A e B	100 µl	100 µl	-
C e D	100 µl	50 µl	50 µl
E e F	100 µl	-	100 µl
G e H	-	100 µl	100 µl

Fonte: A autora (2021).

Foram feitas sucessivas diluições, retirando 50% do conteúdo do poço (figura 1). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Para a interpretação dos resultados da microdiluição em caldo, é observado o crescimento do fungo nos poços, bem como qual a CIM do antifúngico que possui ação contra o *Aspergillus fumigatus*.

Figura 1 - Placa de Elisa pronta para ser incubada
 Fonte: A autora (2021).



Resultados e Discussão

Após a realização do teste da disco-difusão em ágar, as placas de petri não apresentaram a formação de halos em volta dos discos após 24h. As placas contendo discos com uma certa concentração de álcool etílico não apresentaram qualquer inibição. Nas placas de petri contendo 20 µl do extrato alcoólico de *Spirulina platensis*, também não houveram sinais de inibição, ou formação dos halos inibitórios em volta dos discos.

Quanto ao teste da microdiluição em caldo, observou-se o crescimento ou não do fungo a partir de uma turvação ou formação de uma cobertura esbranquiçada no poço. As placas apresentaram crescimento do fungo apenas em alguns poços. O resultado pode ser considerado inconclusivo, pois em alguns poços contendo uma maior concentração do antifúngico, houve crescimento do fungo, enquanto em alguns poços contendo uma menor concentração, não houve qualquer sinal de crescimento do *Aspergillus fumigatus*.

Conclusões

A Aspergilose pulmonar é uma doença considerada grave entre pessoas do grupo de risco, além de possuir uma alta taxa de mortalidade, e portanto deve ser levada a sério. Nos últimos anos houve uma crescente preocupação com estudos acerca dessa doença e pesquisas como essa ajudam a ampliar a possibilidade de reduzir os danos causados. Fungos como os do gênero *Aspergillus* são uns dos mais comuns do mundo, e portanto é de extrema importância que pessoas em situação de vulnerabilidade tenham acesso a todos os recursos disponíveis. Como forma de garantir isso, devemos explorar todas as possibilidades à disposição.

Com os resultados obtidos com os testes realizados, concluiu-se que o extrato alcoólico da *Spirulina platensis* não apresenta atividade antifúngica frente a fungos do gênero *Aspergillus spp.* Apesar de estudos anteriores reportarem atividades antimicrobianas do extrato alcoólico de algas, frente a bactérias gram negativas *Salmonella spp.* e bactérias gram positivas *Staphylococcus spp.*, em que a maioria delas foi inibida por 50 mg/ml do extrato, com exceção de algumas que necessitaram de 100 mg/ml, sugere-se que a estrutura morfológica da cianobactéria *Spirulina platensis* pode interferir em suas atividades antimicrobianas frente a fungos filamentosos. Baseando-se nisso, conclui-se que o extrato alcoólico da spirulina não apresenta atividade antifúngica contra os fungos do gênero *Aspergillus fumigatus*. E que essa pesquisa ajudará a entender o possível potencial do uso da *Spirulina platensis* na indústria farmacêutica.

Referências bibliográficas

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. V. 22, n 16, ago 2002. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M38-A.pdf. Acesso em: 16 ago. 2021.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Métodos para o TSA: Microdiluição em Caldo. 2008. Disponível em:
https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm. Acesso em: 17 abr. 2021.

BARBOSA, Rodrigo et al. Aspergilose Pulmonar Invasiva Causada Por *Aspergillus Fumigatus*. **Revista Saúde em Foco**. São Paulo, n. 11, p. 1-5, 2019. Disponível em:
https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/04/40_ASPERGILOSE-PULMONAR-INVASIVA-CAUSADA-POR-ASPERGILLUS-FUMIGATUS.pdf. Acesso em: 12 abr. 2021

BORBA, Vivian; CAMARGO, Lívia. CIANOBACTÉRIA *Arthrospira (Spirulina) platensis*: BIOTECNOLOGIA E APLICAÇÕES. **Revista Oswaldo Cruz**. Centro de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz, p. 1-23, 2019. Disponível em: http://revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_19_Vivian_Borba.pdf. Acesso em: 12 abr. 2021

REVANKAR, Sanjay. Aspergilose. Wayne State University School of Medicine. 2021. Disponível em:
<https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-f%C3%BAngicas/aspergilose>. Acesso em: 18 nov. 2021.

REVANKAR, Sanjay. Aspergilose. **Manual MSD**. Detroit, jul. 2019. Disponível em:
<https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/fungos/aspergilose>. Acesso em: 19 abr. 2021.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. **Vonshak, A.** *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. Londres. Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3, 1997. Acesso em: 16 jun. 2021.