



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
AMAZONAS
CAMPUS MANAUS ZONA LESTE
DEPARTAMENTO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

AYDRA LAINI DE SOUZA CIRÍACO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ISOLADOS DE SEDIMENTOS
DO RIO SOLIMÕES ANTE DERMATÓFITOS DE PEQUENOS ANIMAIS.**

**MANAUS-AM
2022**

AYDRA LAINI DE SOUZA CIRÍACO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ISOLADOS DE SEDIMENTOS
DO RIO SOLIMÕES ANTE DERMATÓFITOS DE PEQUENOS ANIMAIS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao departamento de ensino de graduação e pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito parcial para obtenção do Grau Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Quinto Pereira

**MANAUS - AM
2022**



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

C578a

Ciríaco, Aydra Laini de Souza.

Avaliação de atividade antagônica de isolados de sedimentos do rio solimões ante dermatófitos de pequenos animais./ Aydra Laini de Souza Ciríaco-- Manaus, 2022.

31 f.; il : color, 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas –
Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2022.

Orientador: Profa. Larissa Quinto Pereira.

1. Biotecnologia. 2. Dermatofitose. 3. Medicina veterinária. I. Pereira, Larissa Quinto. II. Título.

CDD – 660.6

AYDRA LAINI DE SOUZA CIRÍACO

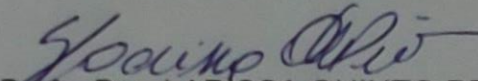
**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ISOLADOS DE SEDIMENTOS
DO RIO SOLIMÕES ANTE DERMATÓFITOS DE PEQUENOS ANIMAIS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao departamento de ensino
de graduação e pós-graduação do Curso
de Medicina Veterinária do Instituto
Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Amazonas (IFAM), como
requisito parcial para obtenção do Grau
Bacharel em Medicina Veterinária.

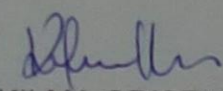
Orientadora: Profa. Dra. Larissa Quinto
Pereira

Aprovado em 23 de novembro de 2022

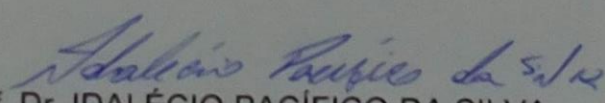
BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. LARISSA QUINTO PEREIRA

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas


Profa. Dra. KILMA CRISTIANE SILVA NEVES

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas


Prof. Dr. IDALÉCIO PACÍFICO DA SILVA

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas

**MANAUS – AM
2022**

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai ao meu querido pai, Antonio Ciríaco da Cruz, que sempre me motivou a estudar e buscar o melhor em mim, que sempre lutou para que eu pudesse ter uma boa educação, sendo meu maior motivo de orgulho, admiração e exemplo. Agradeço a minha mãe, Djanira Oliveira de Souza, que apesar de todas as controvérsias que passamos, o seu apoio foi fundamental para chegar até aqui. Agradeço também a todos meus irmãos que estiveram sempre me perturbando mas que todas as brincadeiras foram meus motivos de seguir em frente e virar uma pessoa que eles possam se orgulhar.

Agradeço enormemente ao meu grande amigo, Luis Felype Garcia de Sousa Caldas, onde nossa amizade perpetuou dentro de toda nossa graduação, vivemos juntos todas as alegrias e tristezas, sem seu companherismo eu não chegaria até onde estou, espero continuar ao seu lado até aonde o tempo permitir. Também te amo peste, saiba que você vale mais que o universo.

Ao professor Gilvan Ferreira da Silva, por ceder a oportunidade de expandir meus horizontes ao abrir o laboratório de biologia molecular introduzir um pouco do seu grande conhecimento sobre a área. A todos os companheiros de laboratório que me receberam e me ajudaram em diversas situações.

Agradeço ainda aos professores Paulo Cesar de Azevedo Filho e Jomel Francisco dos Santos por terem sido o pontapé inicial para minha introdução na área de pesquisa científica. Ao meu professor Edson Francisco do Espírito Santo, que foi um grande mestre e suporte emocional, por ter feito acreditar em mim mesma quando eu já havia desistido. E a minha cara professora Larissa Quinto Pereira, por ter aceitado me orientar dentro deste grande passo da minha vida, tem minha enorme admiração e carinho. Agradeço a todos de coração por tudo e os levo com carinho, nas etapas da vida que vierem.

“Não há nada nobre em ser superior ao
seu semelhante. A verdadeira nobreza é
ser superior ao seu antigo eu”

W. L. Sheldon, 1897

RESUMO:

As dermatofitoses são dermatopatias caracterizadas por serem uma infecção superficial ocasionada principalmente por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia*. Estas enfermidades podem acometer caninos e felinos, possuindo também um potencial zoonótico. Devido às diversas apresentações farmacêuticas dos compostos antifúngicos presentes no mercado e seu fácil acesso, ocorre o uso indiscriminado, promovendo resistência aos principais fármacos utilizados. Por conta da terapêutica não responsiva e altos índices de casos refratários, se elevam os custos e duração dos tratamentos. Na busca para tratamento eficazes, se faz imprescindível a descoberta de novos produtos naturais, para tal é possível estudar microrganismos, já que estes são uma fonte de metabólitos secundários que podem permitir o achado destes produtos naturais com ação antifúngica capazes de transpassar os mecanismos de resistência, resultando numa forma alternativa e menos agressiva de tratamento.

Palavras-chave: Biotecnologia, dermatofitose, antimicrobiano.

ABSTRACT:

Dermatophytosis are skin diseases characterized by being a superficial infection caused mainly by fungi of the genera *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Nannizzia*. These diseases can affect canines and felines, also having a zoonotic potential. Due to the different pharmaceutical presentations of antifungal compounds present on the market and their easy access, indiscriminate use occurs, promoting resistance to the main drugs used. Due to unresponsive therapy and high rates of refractory cases, the costs and duration of treatments increase. In the search for effective treatments, the discovery of new natural products is essential, for this it is possible to study microorganisms, since these are a source of secondary metabolites that may allow the finding of these natural products with antifungal action capable of overcoming resistance mechanisms, resulting in an alternative and less aggressive form of treatment.

Keywords: Biotechnology, dermatophytosis, antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Teste de antagonismo dos isolados oriundo dos sedimentos do rio Solimões frente o patógeno	25
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Demonstrativo da percentagem de inibição de crescimento ante ao patógeno	26
---	----

LISTA DE ABREVIações

BGC	– Cluster Gênicos Biossintéticos
Cluster	– Agrupamento
PDA	– Potate Dextrose Agar
PIC	– Porcentagem de inibição de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVO GERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1. DERMATOFITOSE.....	17
4.2. PRODUTOS NATURAIS.....	18
4.2.1. Metabólitos secundários.....	19
4.2.2. Microrganismos como fontes de metabólitos.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1. Obtenção do isolado fúngico causador de dermatofitose.....	22
5.2. Reativação dos criopreservados.....	22
5.3. Avaliação dos isolados microbianos contra <i>Nannizzia</i> sp.	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1. Crescimento, isolamento e caracterização do dermatófito.	24
6.2. Reativação dos isolados oriundos dos sedimentos do rio Solimões.....	24
6.3. Análise de antibiose dos isolados contra <i>Nannizzia</i> sp.....	25
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são dermatopatias comuns dentro da rotina clínica veterinária, sendo mais associada aos cães, que podem acometer felinos (MACEDO et al, 2021; SOUZA et al, 2022). Caracteriza-se por ser uma infecção superficial ocasionada principalmente por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia*, sendo estes últimos dois gêneros os maiores responsáveis pela clínica em caninos e felinos, em específico o *M. canis* e ocasionalmente o *N. gypsea* (AZEVEDO et al, 2022; SOUZA et al, 2022). A grande problemática desta enfermidade, é que para sua apresentação clínica é necessário que haja um fator imunossupressor, ou seja, o portador pode permanecer assintomático e ser uma fonte de infecção para outros animais e de potencial zoonótico (MACEDO et al, 2021; RIPOLL et al. 2022; SOUZA et al, 2022).

Dentro do atual mercado, existe o livre acesso a diversos fármacos para tratamentos antifúngicos, principalmente os azólicos, que desestabilizam a membrana plasmática pela interferência na síntese do ergosterol (AZEVEDO et al, 2022; SOUZA ET AL. 2022). Porém o uso desenfreado ou incorreto destes compostos eleva a ocorrência dos mecanismos de defesa dentro dos dermatófitos, ou seja, passa a ocorrer uma terapêutica não responsiva com alto índices de casos refratários, em que há elevação de custos e duração na busca de tratamentos eficazes ao combate da enfermidade e que tenham baixa toxicidade (AZEVEDO et al, 2022; RIPOLL et al, 2022; SOUZA et al, 2022). Dado a ocorrência destes desafios a sanidade animal, é imprescindível que haja a busca de isolados e compostos bioativos que atuem como uma alternativa eficaz e de baixo custo, além de apresentarem toxicidade seletiva a fim de garantir a segurança do paciente (RIBEIRO et al, 2021, SOUZA et al, 2022).

Os microrganismos são uma fonte de metabólitos secundários que podem permitir a descoberta de produtos naturais com ação antifúngica capazes de transpassar os mecanismos de resistência, resultando numa forma alternativa e menos agressiva de tratamento (SOUSA, 2021; AZEVEDO et al, 2022; RIPOLL et al, 2022). Neste sentido, o trabalho teve o objetivo de identificar a atividade antagônica a partir de linhagens isoladas nos sedimentos dos rios amazônicos, por meio do teste de antibiose.

2 JUSTIFICATIVA

Devido à grande problemática da saúde pública que é a resistência antimicrobiana, se faz necessário o emprego de novas tecnologias para a obtenção de produtos com ação antifúngica que possam ser empregados na medicina veterinária e humana. Tendo em vista isso, é necessário a avaliação de dos isolados frente a patógenos de interesse veterinário na busca de novos metabólitos secundários ou novas vias para obtenção determinadas moléculas afim de baratear os fármacos de uso veterinário, bem como aumentar a gama de medicamentos que tenham uso terapêutico veterinário.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antagônico ante a atividade fúngica de patógenos de interesse veterinário.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar o isolado fúngico obtido;
- Realizar crescimento do microrganismo causador de dermatofitose;
- Realizar análises de antibiose dos isolados frente ao microrganismo causador de dermatofitose em pequenos animais por meio de teste de antagonismo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. DERMATOFIToses

As dermatofitoses são dermatopatias caracterizadas por serem uma infecção superficial que provoca lesões dérmicas com descamação e alopecia multifocal, sendo ocasionada principalmente por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia* (SOUZA et al, 2022). Estas enfermidades podem acometer caninos e felinos, possuindo também um potencial zoonótico.

As lesões ocasionadas por esta enfermidade estão diretamente relacionadas quanto a espécie do patógeno e a imunidade do hospedeiro. Geralmente caracteriza-se pela presença de pequenas crostas na base dos pelos, levando a alopecia local e/ou disseminada, com descamação e eritema nas regiões acometidas (GOMES et al, 2012). As principais áreas afetadas situam-se ao redor dos olhos e lábios, pescoço, orelhas, extremidades e plano nasal. As lesões tendem a ser extensas quando existe uma cronicidade em animais debilitados ou com tratamentos ineficientes (RIBEIRO et al, 2021).

Sua transmissão ocorre quando existe o contato entre o esporo da enfermidade com o hospedeiro, não possuindo predileção quanto idade, sexo ou raça, porém acaba sendo mais comum visualizar em animais mais jovens ou imunodebilitados, que tendem a ter apresentação clínica (SOUZA, 2022).

O seu diagnóstico é realizado pelo conjunto de informações obtidas do histórico do animal, exame físico, microscopia e cultura fúngica (GOMES et al, 2012; SOUZA, 2022). O principal meio de diagnóstico que pode servir como teste de triagem, é a técnica de lâmpada de Wood, porém deve-se atentar que a não fluorescência não descarta o diagnóstico, já que cerca de 50% das espécies de *M. canis* e outros dermatófitos não emitirem fluorescência quando submetidos ao teste (SOUZA et al, 2022).

O resultado definitivo é realizado por meio de culturas fúngicas, onde as amostras submetidas são cultivadas em meio enriquecido ou seletivo para sua incubação durante pelo menos 14 dias (SOUZA et al, 2022). As amostras podem ser

coletadas por escovação, raspados de pele do animal ou amostras de pelo (GOMES et al, 2012; SOUZA et al, 2022).

4.1.1 Complexo *Nannizzia*

Os dermatófitos pertencem a família dos Arthrodermataceae, que até 2017 eram divididos em três gêneros, após isso foi estabelecido nova taxonomias baseadas não somente ao fenótipo, mas também pelo seu genoma graças a análise da biologia molecular, levando assim a criar novos gêneros, totalizando nove pertencente à família dos Arthrodermataceae: *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Trichophyton*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Guarromyces*, *Ctenomyces* e *Arthroderma* (NOGUEIRA, 2021).

Uma das mudanças notáveis que ocorreram com a nova taxonomia foi a realocação da espécie *Microsporum gypseum*, que passou a ser denominada *Nannizzia gypsea* (JUNIOR et al, 2021). As espécies pertencentes ao gênero *Nannizzia* são fungos geofílicos cosmopolitas, são casos pouco comuns dentro da rotina veterinária e humana. Dentro os dermatófitos zoonóticos a espécie *N. gypsea* é o único que não produz enzimas proteolíticas e ceratolíticas (AMORIM, 2020);

4.2. PRODUTOS NATURAIS

Desde os primórdios da medicina, são diversos os usos dos produtos naturais, como por exemplo, fontes para o desenvolvimento de novos fármacos (LOURENZON, 2021). Sendo amplamente estudado as interações em que o são produzidos bioativos de interesse, seja pela produção de forma direta ou pela interação simbiote entre microrganismos e hospedeiro (LOURENZON, 2021; NEWMAN et al, 2020).

Os bioativos podem ser definidos como substâncias químicas que podem produzir efeitos terapêuticos ou tóxicos, oriundos da interação do microrganismo e ao meio em que está condicionado (tipo de solo, ação do ar, disponibilidade de água, entre outros). Devido à presença destes desafios, os microrganismos são

forçados a desenvolver estratégias de sobrevivência e adaptação (CONTI et al, 2012).

Graças ao desenvolvimento adaptativo entre hospedeiro e microrganismos forma-se, em sua maioria, uma reação simbiótica na qual os bioativos produzidos, os metabólitos secundários, acarretam algum benefício ao hospedeiro, já que o mesmo fornece o ambiente propício para a sobrevivência (CONTI et al, 2012; LOURENZON, 2021). Tais interações são fontes promissoras para bioprospecção de moléculas de interesse, sejam elas novas ou como vias alternativas de produção de moléculas já conhecidas (CONTI et al, 2012; LOURENZON, 2021).

4.2.1. Metabólitos secundários

É de conhecimento comum que a natureza é fonte de diversos produtos naturais com utilização medicamentosa, fato que se construiu com milênios de interação da sociedade e o meio, em que os bioativos são encontrados em animais, plantas e microrganismos (NEWMAN et al, 2020). Atualmente até mesmo os medicamentos ditos como sintéticos tem em sua base produtos de origem biológica, sendo assim, até os dias de hoje a natureza é uma fonte inesgotável para a obtenção destes e de novos produtos naturais (NEWMAN et al, 2020). A bioprospecção é a terminologia correta ao se descrever a exploração dos recursos naturais com a finalidade de obter novos compostos que apresentem atividades de interesse biotecnológico, sendo amplamente utilizada dentro das indústrias farmacêuticas, cosméticas e na agricultura. Por isso é necessário que haja um maior enfoque no desenvolvimento da bioprospecção em áreas como a aquicultura, biorremediação, engenharias biossintéticas e miméticas, nanotecnologia e biomineração de genomas, a fim de carrear um avanço dentro destas áreas (LEE et al, 2020).

A bioprospecção demonstrou que certos organismos podem ser utilizados como fontes importantes de biocompostos, genes e vias metabólicas para a indústria e economia global (LEE et al, 2020). Podendo ressaltar os microrganismos capazes de produzir metabólitos secundários de interesse (HIRUMURUGAN et al, 2018; LEE et al, 2020). Estes são considerados um grupo de moléculas das mais variadas classes químicas, que são produzidas sem que se relacionem ao metabolismo

primário, ou seja, que não são essenciais para a sobrevivência do organismo (HIRUMURUGAN et al, 2018; SOUSA, 2021). Os metabólitos secundários possuem funções únicas como a sinalização intra e interespécies, em especial a função de defesa que é realizada pela produção de compostos antimicrobianos (JENSEN, 2016; THIRUMURUGAN et al, 2018).

Graças a utilização das metodologias *in vitro* obteve-se uma vasta gama de produtos naturais, porém ainda possuindo uma grande desvantagem na prospecção dos metabólitos bioativos de interesse (JENSEN, 2016; ZHOU et al, 2020). No qual as concentrações dos metabólitos produzidos são baixas e sofrem com a interferência do meio laboratorial, em que na maioria das vezes leva os microrganismos a pararem sua produção, este fato torna estas metodologias exaustivas e de alto custo (WRIGHT, 2014; JENSEN, 2016; ZHOU et al, 2020). Porém graças a mineração gênica pode-se reconhecer quando um determinado organismo tem a capacidade ou não de produzir certos metabólitos secundários a partir de seus Clusters gênicos biossintéticos (BGCs) (ZHOU et al., 2020).

Os BGCs são agrupamentos de genes que podem apresentar produção de bioativos de interesse, os metabólitos secundários. As moléculas formadas através desses BGCs são classificadas por classe, sendo as principais descritas: as sintases de peptídeos não ribossomais (NRPS), policetídeos sintases (PKS) tipo I, II e III, terpenos e sideróforos (SILVA, 2016; SILVA, 2020; ZHOU et al, 2020).

4.2.2. Microrganismos como fontes de metabólitos

Diversos estudos são realizados sobre as interações entre microrganismo e hospedeiro na produção de metabólitos secundários, alguns dos principais gêneros utilizados na bioprospecção são as *Streptomyces* e os *Bacillus* (ARAUJO et al, 2010; SILVA, 2020; LOURENZON, 2021). O gênero das *Streptomyces* é amplamente estudado, principalmente para sua utilização na indústria farmacêutica, humana e veterinária, podendo citar a produção de antimicrobianos como a anfotericina B, produzida por *Streptomyces nodosus*, estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, a tetraciclina produzida por *Streptomyces rimosus* e a gentamicina, produzida por *Streptomyces tenebrarius*, que são comumente utilizados na medicina veterinária (ZHANG et al, 2020).

Nos últimos anos ocorreram uma extensa análise quanto as linhagens de *Streptomyces* isoladas de solo, devido a este fator houve uma baixa em relação aos achados de novos bioativos, levando a busca em outros ambiente para descobrir novas espécies (SILVA, 2020; LOURENZON, 2021). Neste âmbito a Amazônia tem sido uma grande fonte de bioprodutos naturais graças a sua vasta diversidade e tem-se favorecido a bioprospecção de fármacos com ação antifúngica (SILVA, 2016; LOURENZON, 2021).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção do isolado fúngico causador de dermatofitose

Para o isolamento do patógeno realizou-se sua inoculação em placa contendo meio PDA, com material oriundo de raspado de um felino. O raspado foi cedido por um médico veterinário de campo, após realizar atendimento de um felino com suspeita de dermatofitose.

O animal apresentava sinais de lesões dérmicas como descamação e eritema da pele, além de alopecia, falta de pelos, na região de face, principalmente ao redor do olhos e boca, no pescoço e na base da cauda, permitindo ainda identificar nestas regiões a presença de prurido. Decorrente do quadro do animal, pelo seu histórico de imunodebilitado com os sinais clínicos relatados, bem com os dados da anamnese, como espécie, raça e idade. A suspeita clínica se deu como dermatofitose.

O raspado foi colocado em placa de meio PDA a uma temperatura de 28°C (GOMES et al, 2012) por 15 dias, para o isolamento do agente, em seguida as colônias que apresentaram variação morfológica tiveram um disco de ágar de 0,8 cm retiradas com auxílio de um perfurocortante e postas novamente em placas de meio PDA para purificação das colônias. Repetindo o procedimento sempre que necessário até a purificação e obtenção do isolado que apresentava as características morfológicas de um dos gêneros que ocasionam a dermatofitose.

5.2. Reativação dos criopreservados

Os isolados obtidos foram oriundos de sedimentos do rio Solimões pelo projeto PROCAD-AmazonMicro, que tinha como objetivo Prospecção de moléculas e desenvolvimento de produtos e/ou processos biotecnológicos com base na microbiota amazônica. Esse preservados foram armazenados em freezer na temperatura de -80 °C em meio ISP2 líquido com glicerol.

A reativação dos isolados foram realizadas a partir da pipetagem de 50 µL de tubo eppendorf contendo os criopreservados fazendo sua deposição em placas com meio ISP2 e LB sólido com o período de incubação de 7 dias na temperatura de 28

°C. Sendo repicado em sequência em novas placas contendo o mesmo meio de cultura.

5.3. Avaliação dos isolados microbianos contra *Nannizzia* sp.

Para a avaliação dos isolados utilizou-se o método de pareamento de cultura dupla, no qual um disco de ágar de 0,8 cm contendo o micélio do patógeno é depositado no centro de cada placa (99x99 mm) contendo meio PDA (Potate Dextrose Ágar) (OLHER et al, 2021). Realizando a deposição em triplicata com estriamento duplo completo e espaçamento entre plugues de aproximadamente 2 cm, e um controle negativo contendo apenas o plugue do patógeno. As placas foram inoculadas a uma temperatura de 28°C durante 15 dias (GOMES et al, 2012; MACEDO et al, 2021). Sendo avaliadas em relação a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) durante o 5°, 10° e 15° dia de incubação, sendo calculada a partir da fórmula utilizada por Olher et al. (2021).

O PIC é calculado para verificar a taxa de inibição em relação ao tratamento realizado e a área de controle, podendo ser expressão na equação:

$$PIC (\%) = \frac{(\text{control diameter} - \text{treatment diameter}) \times 100}{\text{treatment diameter}}$$

A ação antagônica além de ser visualizada, teve seu registro fotográfico realizado no quinto, décimo e décimo quinto

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Crescimento, isolamento e caracterização do dermatófito.

A partir da inoculação do raspado em placa PDA e sua purificação, obteve-se um isolado que apresentava uma colônia plana com aspecto granular e coloração creme, que recobria quase por completo a placa, em sua visualização reversa era perceptível pigmentos amarelos-amarronzados. As presentes características correspondiam ao crescimento do gênero *Nannizzia*, entrando de acordo com achados de Júnior et al (2021), em que no seu isolamento chegou a obter uma colônia com aspecto pulverulento com coloração creme e pigmentação amarela em seu reverso.

6.2. Reativação dos isolados oriundos dos sedimentos do rio Solimões.

Foram cedidos 22 isolados criopreservados oriundos de sedimentos do Rio Solimões, onde foram selecionados de forma randômica cinco para realização das atividades, destes três apresentavam características morfológicas de actinomicetos e dois com características referentes ao gênero *Bacillus*.

A morfologia referente aos actinomicetos é geralmente descrita como bactérias gram negativas, com formas que variam de cocobacilares à bacilares delgados ou em formações em cadeia com estruturas de crescimento similares a ramificações de hifas e esporos. Conforme o descrito por Oliveira et al (2021) as colônias de actinomicetos podem apresentar-se em diversos aspectos, variando de lisas a rugosas com bordas irregulares, fato observável nos isolados SOL 94, SOL 117 e SOL 122, que possuíam essas características – colônias similares ao crescimento fúngica com suas bordas variando num aspecto granular a enrugado – confirmando que estes isolados pertenciam ao filo das actinobactérias.

De acordo com o estudo de Nascimento et al. (2014) o gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram-positivas em forma de bastonetes, suas colônias têm aspecto liso com bordas também lisas com coloração creme, fato observável nos isolados SOL 82 e SOL 104, em que seu crescimento era liso, achatado, com bordas lisas e coloração creme, corroborando que estes pertencem ao gênero *Bacillus*.

6.3. Análise de antibiose dos isolados contra *Nannizzia* sp.

Os isolados bacterianos foram testados frente o patógeno veterinário, a *Nannizzia* sp, por meio do teste de antagonismo. Obteve-se resultados positivos em dois microrganismos, os isolados SOL 94 e SOL 117, ambos actinomicetos, em que houve uma alta porcentagem de inibição de crescimento micelial (Figura 1).

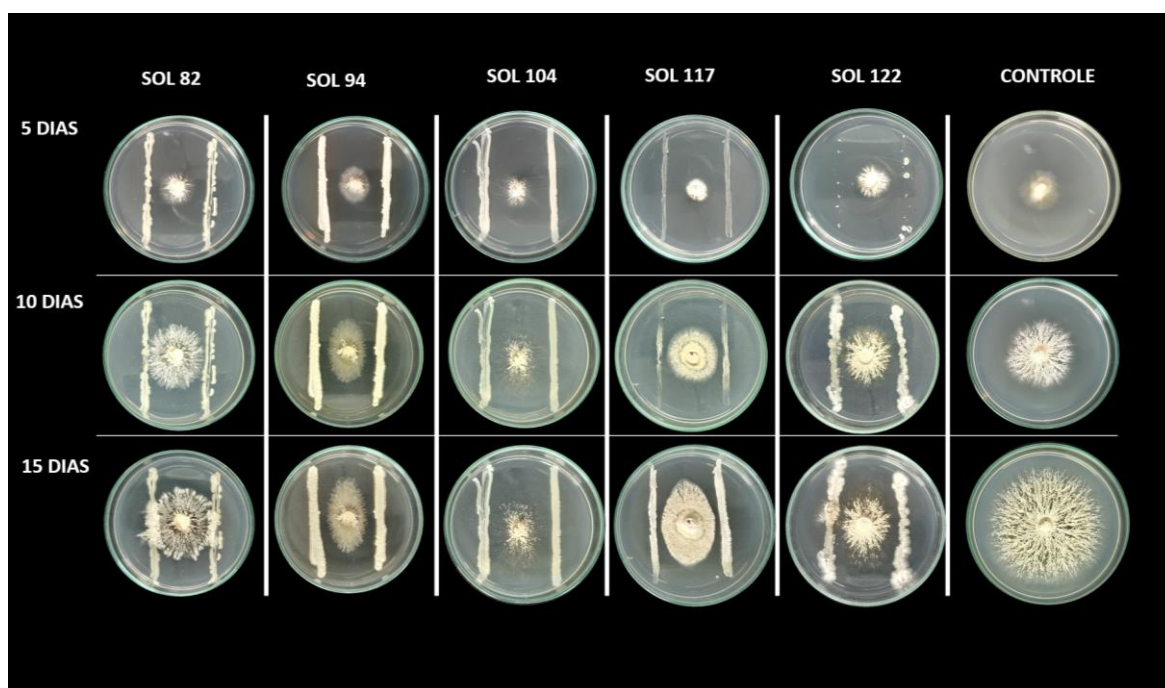


Figura 1: Teste de antagonismo dos isolados oriundo dos sedimentos do rio Solimões frente o patógeno.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Os isolados SOL 82 e 104, apresentaram características semelhantes as pertencentes as do gênero *Bacillus* e por sua vez, apresentaram baixa inibição, conforme visto na TABELA 1. Tendo em vista que as hifas da *Nannizzia* transpassaram as estrias bacterianas destes isolados nas placas. Estes isolados quando comparados ao estudo de Araújo (2010) tiveram seus resultados similares onde apenas 25% de seus isolados apresentaram taxas significativas de antagonismo fúngico. Apesar da pouca atividade dos presentes isolados o gênero *Bacillus* tem sido estudado principalmente para bioprospecção de moléculas de ação antimicrobiana.

Uma outra bactéria que apresentou índices de inibição baixo foi a SOL 122, conforme Tabela 1, está por sua vez apresentou um crescimento característico ao dos actinomicetos, realizando inibição física primeiramente ao atuar restando o patógeno na região delimitada, até que este consegue transpassar a barreira de

colônias estriadas (Figura 1).

Considerando todos os isolados avaliados obteve-se valores de PIC que variavam entre as médias de 10, 41% a 60% (Tabela 1).

Tabela 01 – Demonstrativo da percentagem de inibição de crescimento ante ao patógeno.

Linhagem	Porcentagem de Inibição de Crescimento e desvio padrão (%)
SOL 82	36,66 ± 8,8
SOL 94	60,00 ± 1,25
SOL 104	10,41 ± 9,54
SOL 117	51,66 ± 2,60
SOL 122	27,97 ± 9,04

O isolado SOL 94 foi o que apresentou os melhores resultados de porcentagem de inibição, com 60%, e teve um desvio padrão baixo (1,25%), demonstrando um resultado positivo quando comparados aos achados de Olher et al (2021), no qual obteve-se uma PIC entre 19,17% e 39% a partir de um isolado do gênero *Pisolithus* ante o fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Os resultados obtidos vão de encontro com os dados alcançados nos estudos realizados por Silva (2016) ao realizar a avaliação do potencial de produção de composto metabólicos produzidos por uma linhagem de *Streptomyces*, no qual se confirmou o potencial para obtenção de biobrodutos com ação antimicrobiana a partir do isolado e de Lourenzon (2021) que avaliou a partir da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 por meio do cultivo em diversos meios de cultura o potencial de seu isolado, que demonstrou a variação da biossíntese de compostos, sendo mais eficiente sua produção em meio ISP2. O que demonstra o potencial do uso de microrganismos como fonte de bioprodutos, principalmente os já fundamentados bastantes estudados na descoberta de novos produtos naturais e biofármacos, como *Streptomyces* e *Bacillus*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que apenas um dos cinco isolados apresente bons índices de inibição frente a *Nannizzia*, faz-se necessária uma maior investigação com outros isolados visando buscar encontrar novos achados com potencial contra patógenos veterinários, bem como a bioprospecção do isolado SOL 94, a fim de identificar qual o metabólito secundário responsável pela atividade antifúngica, bem como a sua via de biossíntese, por isso são necessários mais estudos sobre a purificação e caracterização de compostos para identificação completa destas moléculas, tendo em vista que o teste de antibiose é um teste de triagem para avaliar se há potencial antibiótico na linhagem bacteriana frente aos isolados de forma a atuar na linha de defesa da resistência aos antifúngicos, decorrente da pressão de seleção, bem como dos tratamentos demorados para essa classe de agentes infecciosos.

REFERÊNCIAS

AMORIM, V. **DERMATOFITOSE POR *Microsporum canis* EM CÃES E GATOS - DIAGNÓSTICO E TERAPIA MEDICAMENTOSA: REVISÃO DE LITERATURA.** Dissertação (Especialização em Microbiologia Clínica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2021.

ARAUJO, F. F. de; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, jul./ago. 2010.

AZEVEDO JUNIOR, P. R. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; MENDES, M. B.; BONCI, M. M.; PAULA, C. R.; BARONI, F. A.; TOZIN, L. R. S.; OLIVEIRA, A. A. Potencial antifúngico "in vitro" de extratos foliares de espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) diante de isolados clínicos veterinários de dermatófitos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, 2022.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: Microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**. v. 64, n. 3, p. 43-47. 2012.

GOMES, A. R.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.272-284, 2012

JENSEN, P. R. Natural Products and the Gene Cluster Revolution. **Trends in Microbiology**. v. 24, n. 12, p. 968-977. 2016.

JUNIOR, S. D. T.; SILVA, P. A.; COELHO, J. A.; RISSO, T. L.; CHRIST, L. X.; SESTI, F.; AZEVEDO, P. R. L. J.; BARONI, F. A. DERMATOFITOSE CAUSADA POR FUNGO PERTENCENTE AO COMPLEXO *NANNIZZIA GYPSEA* (ANT. *MICROSPORUM GYPSEUM*) EM FILHOTES DE CÃO: RELATO DE CASO. In: **XLIV SEMAMBRA - Evento online, 2021**. Disponível em:

<<https://www.doity.com.br/anais/xlivsemambra/trabalho/215200>>. Acesso em: 05/11/2022

LEE, N.; HWANG, S.; KIM, J.; CHO, S.; PALSSON, B.; CHO, B-K. Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v. 18, p. 1548-1556. 2020

LOURENZON, V. B. **Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em *Streptomyces* sp. ICBG311**. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2021.

MACEDO, C. C.; SILVA, W. C.; JUNIOR, R. N. C. C. Revisão sobre dermatofitose em cães e gatos, com enfoque nas implicações clínicas, diagnóstico e tratamento. **Revista Veterinário e Zootecnia**, v. 28, 2021.

NASCIMENTO, S. M. C.; CARVALHO, E. A.; ISHIDA, A. K. N.; SILVA, J. C.; CARVALHO, K. B. A.; CONCEIÇÃO, V. D. Diversidade morfológicas de colônias de *Bacillus* sp. **III Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. mar. 2020.

NOGUEIRA, M. A. **FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Nannizzia gypsea* ISOLADAS DE SOLO DE PARQUES DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) – Universidade Paulista. São Paulo. 2021.

OLHER, M. L. A. R.; PEREIRA, D. C. S.; MARTINS, M. L.; MARTINS, E. M. F.; CAMPOS, A. N. R. Controle in vitro do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* por metabólitos e extratos de *Pisolithus microcarpus*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.2, p. 15008-15025, 2021.

OLIVEIRA, F. S.; CARVALHO, B. F.; MARTINS, F. B.; BEZERRA, N. V. Bioprospecção e avaliação do potencial antimicrobiano de actinobactérias do solo rizóide de açaí (*Euterpe oleracea*) no Município de Igarapé-Açu no estado do Pará. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p. 64309-64318, 2021

RIBEIRO, S. M. M.; SOUSA, S. K. S. A.; GALIZA, L.; PEREIRA, E. C.; COUCEIRO, G. A.; MENESES, A. M. C. Estudo retrospectivo da casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. **Research, Society and Development.**, v. 10, n. 5, 2021.

RIPOLL, M. K.; MARTINS, O. A.; WALLER, S. B.; SILVA, A. L.; FARIA, R. O.; GOMES, A. R.; PICOLI, T.; MEIRELES, M. C. A.; ACUNHA, T. S.; CHAVES, F. C.; MELLO, J. R. B. Atividade antifúngica in vitro de extratos aquosos do bagaço da Oliveira (*Olea europaea* L.) frente a isolados fúngicos causadores de candidíase, dermatofitose e esporotricose em humanos e animais. **Research, Society and Development.**, v. 11, n.6, 2022.

SILVA, A. N. **Análise Genômica e Metabolômica de uma Linhagem de *Streptomyces galbus* Isolada do Semiárido Paraibano**. Dissertação (graduação em biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2020.

SILVA, I. R. **Caracterização de Compostos de Antimicrobianos Produzidos por *Streptomyces* sp.** Dissertação (doutorado em biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2016.

SOUSA, P. F. R. **Prospecção Genômica de Metabólitos Bioativos Provenientes de Microalgas Extremófilas: Aplicações na Área da Saúde**. Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2021.

SOUZA, C. C. N.; SOUZA, M. L. P.; BURLAMAQUI, E. P. A. S.; BARROZO, P. H. M.; ROSARIO, M. K. S.; BRITO, J. S.; MARTINS, F. M. S.; NETA, A. A. M. Q.;

CASSEB, A. R.; SOUSA, S. K. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão e ocorrência no hospital veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. **Scientific Electronic Archives.**, v. 15, n. 8, 2022.

THIRUMURUGAN, D. et al. An introductory chapter: secondary metabolites. **Second metab sources Appl**, p. 1 21, 2018.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: Revisiting natural products in Antibiotic drug discovery. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 147 154, 2014.

ZHANG, B.; ZHOU, Y. T.; JIANG, S. X.; ZHANG, Y. H.; HUANG, K.; LIU, Z. Q.; ZHENG, Y. G. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: quantitative analysis of metabolism via LC–MS/MS based metabolomics for rational design. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 18, 2020.

ZHOU, Q.; NING, S.; LUO, Y. Coordinated regulation for nature products discovery and overproduction in *Streptomyce*. **Synthetic and Systems Biotechnology**. v. 5, n. 2, p. 49-58. 2020.