



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019**

Ensaio *in vitro* de ação inibitória das culturas de bactérias lácticas sobre dermatófitos que causam onicomicose.

Bruno Pinto da Silva¹; Elinalva Maciel Paulo²; Ilana Maciel Paulo Mamedio³

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: brunosl403@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamacielp@gmail.com
3. Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ilana_mamedio@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: dermatófitos, bactérias lácticas, antagonismo.

INTRODUÇÃO

Onicomicose é uma das dermatoses mais frequentes, que pode afetar humano e animais, sendo principalmente causada por dermatófitos, que constituem um grupo de fungos queratinofílicos. Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e possuem alta taxa de recidiva dos dermatófitos diante do uso de tratamentos tópicos convencionais.

Trabalhos realizados por Mukherjee et al., 2003 foi detectado cepas de *T. rubrum* com baixa suscetibilidade à terbinafina, uma dos fungicidas mais utilizados em dermatofitoses causadas por *T. rubrum*. Uma alternativa natural para substituir o uso destas drogas que comumente causa resistência no tratamento de micose consiste na utilização de culturas de Bactérias Ácido Lácticas (BAL), por produzirem metabólitos com potencial de inibir o desenvolvimento dos fungos dermatófitos (GUO et al., 2012). Assim, surge como uma importante alternativa no controle de agentes patogênicos seja de origem bacteriana ou fúngica. Tamanini (2008) relata que ação inibitória desses microrganismos se dá pela exclusão competitiva e/ou através da produção de uma gama de substâncias, resultantes do seu metabolismo, com potencial antimicrobiano, interferindo na sua capacidade de sobrevivência (bactericida) e/ou multiplicação (bacteriostática) de agentes microbianos.

Dessa maneira, este trabalho pretende contribuir com a pesquisa no controle de micoses causadas por dermatófitos, sinalizando a melhor conduta metodológica nesse tipo de investigação, através da proposta de comparar duas técnicas “*in vitro*”, de inibição bacteriana, com o intuito de avaliar qual destas técnicas se torna mais adequada para realizar pesquisa laboratorial no controle de crescimento dos dermatófitos.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Os 30 isolados de BAL utilizados nesse trabalho foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública-LAMASP/UEFS, sendo identificados na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG pelo método proteômico (Mald Toff). Os dermatófitos (*Microsporum gypseum* 6199 e *Trichophyton mentagrophytes* 6272), causadores de onicomicose, foram provenientes da Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Os isolados de bactérias ácidos lácticas foram ativados em caldo MRS (Difco®), e incubados por 48h à 35 °C para a realização do ensaio de antagonismo. Para tal foi realizada um

screening de inibição microbiana, confrontando trinta cepas de bactérias láticas contra duas espécies de dermatófitos, utilizando dois métodos: cultura mista e difusão em disco.

A técnica de Difusão em disco em meio sólido, foi realizada de acordo com Corsetti et al. (1998), com modificações, em que foi semeado em uma placa de Petri, contendo Agar Batata Dextrosado, suspensão de propágulos de dermatófitos a uma concentração de 10^4 conídios/mL-1, sendo em seguida colocados discos de papel impregnados com as culturas láticas. As placas foram incubadas a 22°C/5 dia.. No controle negativo foi utilizando água destilada estéril e no controle positivo (presença de efeito inibitório) foi utilizado o medicamento Cloridrato de Terbinafina. Após o período de incubação, foi realizada a leitura, avaliando a presença e ausência e o tamanho do halo de inibição.

O método da cultura mista consiste no princípio de ação inibitória de substâncias antimicrobianas produzidas por um microrganismo visando impedir a proliferação de outro microrganismo, formando um co-cultivo (SILVA, 2015). No presente experimento, suspensão de esporos na concentração de 10^4 conídios/mL dos isolados dermatófitos foram adicionados em tubos contendo 10mL de culturas láticas. Os tubos com a mistura foram mantidos no refrigerador a 6,0 °C por 24h., logo após a mistura foi semeada a em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo as placas incubadas a 28 °C por sete dias. Após este período foi observado se houve ou não crescimento do fungo na placa. O controle negativo (ausência de efeito fungicida) foi realizado com água destilada estéril (1mL), e o controle positivo (presença de efeito fungicida) foi com medicamento Terbifina 250mg na proporção de 1 mL.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Nas tabelas 1 e 2 estão tabulados todos os dados do trabalho, onde foram confrontadas as bactérias láticas frente aos dermatófitos utilizando dois métodos de antagonismo.

Tabela 1, Resultado da atividade antifúngica (Cultura Mista e difusão em disco) das bactérias lácticas frente ao *Microsporium gypseum*

Bactérias Lácticas	Morfologia (coloração de Gram)	pH	Atividade antifúngica	
			Difusão em Disco Ø do Halo em mm	Cultura Mista
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	Cocos+	5,1	10,0 +	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	22,5 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	22,5 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	17,5 ++	+
<i>Enterococcus durans</i> *	Bacilos+	3,4	24,0 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	19,0 ++	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,3	21,5 ++	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Bacilos+	3,4	21,0 ++	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,7	0,0 -	+**
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	10,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	11,0 +	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,4	13,5 +	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	10,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	16,0 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	12,0 +	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,6	12,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,4	12,0 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	8,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	11,5 +	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,5	5,0 +	+
<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos+	5,2	13,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Bacilos+	3,3	12,0 +	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	11,5 +	+

*A morfologia não condiz com identificação da espécie pelo MALDI TOF.

**Crescimento reduzido do fungo.

Tamanho dos halos de inibição estabelecidos pelos critérios de Rouse et al. (2008) in Franco (2010): (-) nenhuma inibição; (+) inibição muito fraca com halos de 1 a 15 mm; (++) inibição moderada com halos de 16 a 30 mm; (+++) inibição média com halos de 31 a 45 mm; (++++) inibição extensiva com halos maiores que 45mm

Tabela 2. Resultado da atividade antifúngica (Cultura Mista e Difusão em Disco) pelas bactérias lácticas frente ao *Trichophyton mentagrophytes*

Bactérias Lácticas	Morfologia (coloração de Gram)	pH	Atividade antifúngica	
			Difusão em Disco Ø do Halo em mm	Cultura Mista
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	Cocos+	5,1	20,0 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	12,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	12,0 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Enterococcus durans</i> *	Bacilos+	3,4	7,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,3	13,5 +	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,7	0,0 -	+**
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	18,0 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	28,0 ++	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	16,0 ++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	13,2 +	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,4	8,0 +	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	13,4 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	12,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	13,0 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	12,5 +	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,6	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,4	0,0 -	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	11,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	12,5 +	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,5	8,0 +	+
<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos+	5,2	10,5 +	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	0,0 -	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Bacilos+	3,3	0,0 -	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	10,5 +	+

*A morfologia não condiz com identificação da espécie pelo MALDI TOF.

**Crescimento reduzido do fungo.

Tamanho dos halos de inibição estabelecidos pelos critérios de Rouse et al. (2008) in Franco (2010): (-) nenhuma inibição; (+) inibição muito fraca com halos de 1 a 15 mm; (++) inibição moderada com halos de 16 a 30 mm; (+++) inibição média com halos de 31 a 45 mm; (++++) inibição extensiva com halos maiores que 45mm

Avaliando os dois métodos *in vitro* testados neste trabalho quanto ao antagonismo das BAL sobre os dois dermatófitos (Tabela 1 e 2), ambos apresentaram atividade inibitória, sendo que no método da cultura mista, os resultados foram mais expressivos. Isto se deve ao fato de que no primeiro método, pelo fato da cultura bacteriana possuir metabólitos de peso molecular elevado, dificultava a difusão destes compostos no meio, o que pode ser constatado pelo fungicida Terbinafina, que por ser um produto metabólito comercial e já purificado, se torna mais fácil a sua difusão, propiciando assim, maior formação de halo de inibição. Por sua vez, no método da cultura mista, os esporos fúngicos ficaram imersos na cultura bacteriana por 24h, dando condição dos metabólitos interagirem com estas estruturas, impedindo o desenvolvimento dos fungos, quando cultivados em meios apropriados.

Os mecanismos antagônicos observados podem ser resultantes de diferentes ações, como a produção de substâncias pelas bactérias que interferem no metabolismo e desenvolvimento de outro microrganismo (PASINI, 2009). Apesar da produção de ácidos orgânicos serem atribuídos como um agente inibitório (TSUBOI, 1989), neste trabalho foi

observado que nem todas as culturas lácticas que apresentaram pH baixo conseguiram impedir o crescimento fúngico. Outro fator que contribui para diminuição da quantidade de um dos microrganismos localmente é a disputa por recursos alimentares (ALVES, 2007) e temos, também, a disputa por espaço para crescerem, onde um dos microrganismos tende a colonizar mais rapidamente que o outro (SHARMA et al.,2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Avaliando dois métodos de antagonismo das bactérias lácticas sobre os fungos *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, pode-se inferir que as bactérias lácticas em estudo exercem efeito inibitório sobre estes dermatófitos causadores de unicomiose. Porém, para se obter resultados mais expressivos, o método da cultura mista, se mostra mais eficiente comparado ao método da difusão em disco.

REFERÊNCIAS

CORSETTI, A. et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p. 253-256, 1998.

GUO, et al. “Antifungal Activity of *Lactobacillus* against *Microsporium Canis*, *Microsporium Gypseum* and *Epidermophyton Floccosum*.” *Bioengineered Bugs* 3.2 (2012): 102–111. PMC. Web. 16 Mar. 2018.

PAULO, E.M. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico. 1991. 73f. Tese – Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

SÁ, J. O. de. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichordema* spp. 2009. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas- Bahia, 2009.

SHARMA, R.R., SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, v.50, p. 205–221, 2009.

SILVA, J. R. Avaliação de métodos “in vitro” para detecção de bactérias lácticas com potencial de atividade antagônica frente à enteropatógenos. 2015. 27p.(Monografia- Trabalho de conclusão de curso)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2015.

TAMANINI, R. Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

TSUBOI R, KO IJ, TAKAMORI K, OGAWA H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun*. 1989;57:3479-83.