



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ACTINOMICETOS ISOLADOS DO PARQUE DO UTINGA**

**Belém
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ACTINOMICETOS ISOLADOS DO PARQUE DO UTINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna

**Belém
2022**

Marcon, Davi

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DO PARQUE DO UTINGA/ DAVI JOSUÉ MARCON. – Belém, 2022.

29 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna

Monografia – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2022.

1. Actinomicetos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Isolamento. 4. Identificação. I. Título.

ERRATA

Elemento opcional da ABNT (2011, 4.2.1.2). Exemplo:

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
1	10	auto-conclavo	autoconclavo

DAVI JOSUÉ MARCON

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ACTINOMICETOS ISOLADOS DO PARQUE DO
UTINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Data da Defesa:
Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Orientador

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Membro da Banca

Prof. Dra. Nome Sobrenome
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Membro da Banca

Belém
2022

*Este trabalho é dedicado a todos aqueles que,
de alguma forma abdicaram de algo e/ou a si mesmos
pela Ciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos que contribuíram diretamente para o desenvolvimento desse trabalho:
Aos desenvolvedores, usuários e contribuintes ao projeto $\text{abnT}_\text{E}\text{X}2$ e ao $\text{L}^\text{A}\text{T}_\text{E}\text{X}$,

Agradecimentos aos que contribuíram indiretamente ao trabalho e diretamente com
minha formação:

*“A consistência é contrária
à natureza, contrária à vida.
As únicas pessoas completamente
consistentes são os mortos.
(Aldous Huxley - Do What You Will)*

RESUMO

Segundo a ABNT, o resumo deve ressaltar o objetivo, o método, os resultados e as conclusões do documento. A ordem e a extensão destes itens dependem do tipo de resumo (informativo ou indicativo) e do tratamento que cada item recebe no documento original. O resumo deve ser precedido da referência do documento, com exceção do resumo inserido no próprio documento. (...) As palavras-chave devem figurar logo abaixo do resumo, antecidas da expressão Palavras-chave:, separadas entre si por ponto e finalizadas também por ponto.

Palavras-chave: latex. abntex. editoração de texto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antibióticos utilizados como controle	18
--	----

LISTA DE ALGORITMOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

abnTeX ABsurdas Normas para TeX

LISTA DE SÍMBOLOS

Γ	Letra grega Gama
Λ	Lambda
ζ	Letra grega minúscula zeta
\in	Pertence

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Contexto	16
1.2	Justificativa	16
1.3	Objetivos	16
1.3.1	Objetivo Geral	16
1.3.2	Objetivos Específicos	16
1.4	Metodologia	17
1.4.1	Isolamento e obtenção das amostras	17
1.4.2	Extração de DNA e identificação das espécies	17
1.4.3	Identificação de perfil clonal	17
1.4.4	Teste de bioatividade	17
1.4.4.1	Obtenção dos extratos	17
1.4.4.2	Teste de difusão em poço	18
1.5	Estrutura do Trabalho	18
2	REFERENCIAIS TEÓRICOS	19
2.1	Actinomicetos	19
2.2	Metabolitos secundários e a descoberta de fármacos	19
2.3	Produção de substâncias antimicrobianas	19
3	RESULTADOS	20
4	CONCLUSÃO	21
	REFERÊNCIAS	22
	APÊNDICES	23
	APÊNDICE A – QUISQUE LIBERO JUSTO	24
	APÊNDICE B – NULLAM ELEMENTUM URNA	25
	ANEXOS	26
	ANEXO A – MORBI ULTRICES RUTRUM LOREM	27
	ANEXO B – CRAS NON URNA SED	28
	ANEXO C – FUSCE FACILISIS LACINIA DUI	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

Actinomicetos são um filo de microorganismos gram-positivos de alto conteúdo guanina e citosina que contém as classes: Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria, e Thermoleophilia(YADAV et al., 2018). Dentre suas principais características podemos ressaltar a presença de micélios e a produção de hifas filamentosas (CHATER, 2016).

Actinobactérias foram uma grande fonte para o desenvolvimento de diversos compostos como: e segundo Genilloud (2017) continuam sendo uma fonte relevante para o isolamento de caracterização de compostos de interesse biotecnológicos, com o emprego de metodologias modernas de investigação podem continuar a fornecer substâncias de impacto mercadológico.

1.2 Justificativa

Actinomicetos são interessantes alvos para a descoberta de compostos de relevância farmacológica, especialmente como solução para os crescentes níveis de resistência a antimicrobianos encontrados em microorganismos patogênicos. O isolamento desses microorganismos, especialmente do ambiente amazônico, é um passo importante em busca do desenvolvimento de novos fármacos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Determinar a produção de compostos antimicrobianos de actinomicetos provenientes do solo do parque do utinga

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar e caracterizar os organismos em nível de espécie
2. Determinar o perfil clonal e a distância filogenética entre os isolados
3. Categorizar os microorganismos quanto a produção de compostos bactericidas.

1.4 Metodologia

1.4.1 Isolamento e obtenção das amostras

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo foram obtidas do banco de isolados de outro trabalho, disponibilizados pelo Centro de Genômica e Biologia de sistemas. As quais foram obtidas a partir da cultura em meio Ágar Amido Proteína-M (HI-MEDIA) para isolamento de actinomicetos.

1.4.2 Extração de DNA e identificação das espécies

Os microorganismos foram cultivados em meio TSB e centrifugados a 13000rpm por 15 minutos, os *pellets* foram coletados e utilizados para extração usando o kit DNEasy e método adaptado de extração usando fenol-clorofórmio-álcool-isoamil. O DNA gênomico extraído foi quantificado utilizando espectrofotometria com NanoDrop(Thermo Fisher) e visualizado em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio. Foi utilizada PCR com os primers para amplificação do RNA ribossomal 16s, os amplicons foram sequenciados utilizando 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos *forward* e *reverse* foram alinhados utilizando BioEdit(TODO) e as *contigs* produzidas foram alinhadas ao banco de dados de RNA ribossomal do NCBI com a ferramenta BLAST e as espécies dos organismos foram determinadas utilizando homologia.

1.4.3 Identificação de perfil clonal

Para análise de perfil clonal foi utilizada PCR para sequências palindrômicas extragênicas repetidas(*REP*) com os primers F e R, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1.5% com adição de 0.5% de brometo de etídio por 1 hora e 30 minutos, com corrente de 70V 70mAh e 70W.

O gel foi fotografado e o tamanho dos fragmentos foi analisado usando a ferramenta Gel Analyzer e uma tabela com os dados foi utilizada para cálculo de *clusters* dos isolados e criação de um dendograma com o uso de um *script* na linguagem R.

1.4.4 Teste de bioatividade

1.4.4.1 Obtenção dos extratos

Isolados que durante o isolamento inibiam o crescimento de outras amostras e outros 37 com perfis clonais diferentes foram cultivados em meio Ágar TSB para reativação. Após isso, foram inoculados em Caldo TSB de 1 a 5 dias até turvação completa do meio, esse caldo foi centrifugado a 9000G por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0.22 μ m para uso no mesmo dia.

Tabela 1 – Antibióticos utilizados como controle

Bactéria	Antibiótico controle
<i>Escherichia coli</i> ATCC 292	Impinem
<i>Staphylococcus aureus</i>	Impinem
<i>Corynebacterium fimi</i>	?
<i>Escherichia coli</i> APC43A	?

Fonte: Autor

1.4.4.2 Teste de difusão em poço

Foi utilizado teste de difusão em poço para determinação de atividade antimicrobiana, para isso foi utilizado meio Mueller-Hinton Ágar, com furos de 10mm de diâmetro. Em cada furo foi depositado 50µL de extrato, as cepas teste utilizadas foram: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Corynebacterium fimi* NTC5, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e um isolado resistente de *Escherichia coli*(APC43A) obtido em estudo anterior (FREITAS et al., 2019). Para cada teste, foi preparado inóculo em solução salina 1% com ajuste para 0.5 na escala McFarland, essa solução foi uniformemente espalhada com uso de swab estéril.

Como controles positivos foram utilizados discos de antibióticos com eficácia para cada uma das cepas controle, conforme descrito nas normas de controle e análise para testes de substâncias antimicrobianas (CLSI, 2020).

Os halos de inibição foram medidos após o crescimento de 24 horas a 30°C e foram elaborados graficos utilizando a uso da ferramenta R com o uso do pacote ggplot2.

1.5 Estrutura do Trabalho

2 REFERENCIAIS TEÓRICOS

2.1 Actinomicetos

2.2 Metabolitos secundários e a descoberta de fármacos

2.3 Produção de substâncias antimicrobianas

3 RESULTADOS

4 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação — trabalhos acadêmicos — apresentação. Rio de Janeiro, 2005. 9 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação — trabalhos acadêmicos — apresentação. Rio de Janeiro, 2011. 15 p. Substitui a Ref. ABNT (2005).

CHATER, K. F. Recent advances in understanding streptomycetes. **F1000Research**, Faculty of 1000 Ltd, v. 5, 2016.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30. ed. Wayne, PA: CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

FREITAS, D. Y. et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacteria recovered from an amazonian lake near the city of belém, brazil. **Frontiers in microbiology**, Frontiers Media SA, v. 10, p. 364, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00364>>.

GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. **Natural product reports**, Royal Society of Chemistry, v. 34, n. 10, p. 1203–1232, 2017.

YADAV, A. N. et al. Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 13–41.

Apêndices

APÊNDICE A – QUISQUE LIBERO JUSTO

Quisque facilisis auctor sapien. Pellentesque gravida hendrerit lectus. Mauris rutrum sodales sapien. Fusce hendrerit sem vel lorem. Integer pellentesque massa vel augue. Integer elit tortor, feugiat quis, sagittis et, ornare non, lacus. Vestibulum posuere pellentesque eros. Quisque venenatis ipsum dictum nulla. Aliquam quis quam non metus eleifend interdum. Nam eget sapien ac mauris malesuada adipiscing. Etiam eleifend neque sed quam. Nulla facilisi. Proin a ligula. Sed id dui eu nibh egestas tincidunt. Suspendisse arcu.

APÊNDICE B – NULLAM ELEMENTUM URNA

Nunc velit. Nullam elit sapien, eleifend eu, commodo nec, semper sit amet, elit. Nulla lectus risus, condimentum ut, laoreet eget, viverra nec, odio. Proin lobortis. Curabitur dictum arcu vel wisi. Cras id nulla venenatis tortor congue ultrices. Pellentesque eget pede. Sed eleifend sagittis elit. Nam sed tellus sit amet lectus ullamcorper tristique. Mauris enim sem, tristique eu, accumsan at, scelerisque vulputate, neque. Quisque lacus. Donec et ipsum sit amet elit nonummy aliquet. Sed viverra nisl at sem. Nam diam. Mauris ut dolor. Curabitur ornare tortor cursus velit.

Morbi tincidunt posuere arcu. Cras venenatis est vitae dolor. Vivamus scelerisque semper mi. Donec ipsum arcu, consequat scelerisque, viverra id, dictum at, metus. Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut pede sem, tempus ut, porttitor bibendum, molestie eu, elit. Suspendisse potenti. Sed id lectus sit amet purus faucibus vehicula. Praesent sed sem non dui pharetra interdum. Nam viverra ultrices magna.

Aenean laoreet aliquam orci. Nunc interdum elementum urna. Quisque erat. Nullam tempor neque. Maecenas velit nibh, scelerisque a, consequat ut, viverra in, enim. Duis magna. Donec odio neque, tristique et, tincidunt eu, rhoncus ac, nunc. Mauris malesuada malesuada elit. Etiam lacus mauris, pretium vel, blandit in, ultricies id, libero. Phasellus bibendum erat ut diam. In congue imperdiet lectus.

Anexos

ANEXO A – MORBI ULTRICES RUTRUM LOREM

Sed mattis, erat sit amet gravida malesuada, elit augue egestas diam, tempus scelerisque nunc nisl vitae libero. Sed consequat feugiat massa. Nunc porta, eros in eleifend varius, erat leo rutrum dui, non convallis lectus orci ut nibh. Sed lorem massa, nonummy quis, egestas id, condimentum at, nisl. Maecenas at nibh. Aliquam et augue at nunc pellentesque ullamcorper. Duis nisl nibh, laoreet suscipit, convallis ut, rutrum id, enim. Phasellus odio. Nulla nulla elit, molestie non, scelerisque at, vestibulum eu, nulla. Ut odio nisl, facilisis id, mollis et, scelerisque nec, enim. Aenean sem leo, pellentesque sit amet, scelerisque sit amet, vehicula pellentesque, sapien.

ANEXO B – CRAS NON URNA SED

Sed consequat tellus et tortor. Ut tempor laoreet quam. Nullam id wisi a libero tristique semper. Nullam nisl massa, rutrum ut, egestas semper, mollis id, leo. Nulla ac massa eu risus blandit mattis. Mauris ut nunc. In hac habitasse platea dictumst. Aliquam eget tortor. Quisque dapibus pede in erat. Nunc enim. In dui nulla, commodo at, consectetur nec, malesuada nec, elit. Aliquam ornare tellus eu urna. Sed nec metus. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas.

ANEXO C – FUSCE FACILISIS LACINIA DUI

Phasellus id magna. Duis malesuada interdum arcu. Integer metus. Morbi pulvinar pellentesque mi. Suspendisse sed est eu magna molestie egestas. Quisque mi lorem, pulvinar eget, egestas quis, luctus at, ante. Proin auctor vehicula purus. Fusce ac nisl aliquam ante hendrerit pellentesque. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos hymenaeos. Morbi wisi. Etiam arcu mauris, facilisis sed, eleifend non, nonummy ut, pede. Cras ut lacus tempor metus mollis placerat. Vivamus eu tortor vel metus interdum malesuada.