

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS DE LEVEDURAS PARA DESENVOLVIMENTO DE UM
NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO

LUCIANA SENTER
Bióloga - UNOESC

Porto Alegre
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS DE LEVEDURAS PARA DESENVOLVIMENTO DE UM
NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO

LUCIANA SENTER
Bióloga - UNOESC

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientadora: Dra. Patricia Valente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

S478o Senter, Luciana

Otimização da produção e purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para desenvolvimento de um novo agente antifúngico / Luciana Senter – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Patrícia Valente da Silva

1. Leveduras 2. Antifúngicos 3. Antimicrobianos 4. Candida catenulata
5. Cryptococcus gattii 6. Trichosporon I. Silva, Patrícia Valente da , orient.
II. Título.

CDU 579.2 (043)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde; Laboratório de Bioquímica de Alimentos – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos; e no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica – Centro de Biotecnologia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por acreditarem em mim e pelo incentivo nessa árdua, mas bela caminhada. Ao meu noivo, Cassiano Marcon, que apesar da distância sempre me incentivou e teve paciência em todos os momentos, de entusiasmo e aflição.

À professora Patrícia Valente pela oportunidade, conhecimentos transmitidos, convivência e incentivo nos momentos em que tudo parece estar perdido.

Aos professores Maria Lúcia Scroferneker, José Carlos Germani, Adriano Brandelli e Marilene Henning Vainstein, e aos colegas Ana Paula Folmer Corrêa e Walter Beys, por compartilharem seus conhecimentos e equipamentos para realização dos testes.

Aos colegas de laboratório, Taís Bernardi, Magali Stival, Krëesla Kowalski, Rodolfo Ribas, Cheila Stopiglia e aos amigos Franciele Bücken, Michele Mann e Valdionir Freitas pelo auxílio nos trabalhos e pela descontração. Aos demais amigos e colegas que não foram citados, mas que tiveram uma contribuição especial para minha formação.

À UFRGS pela oportunidade do ensino e à CAPES pela bolsa de estudos.

Meu muito obrigada!

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE LEVEDURAS PARA DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO

Autor: Luciana Senter

Orientador: Prof. Dr. Patricia Valente

¹RESUMO

Infecções fúngicas em humanos vem aumentando nos últimos anos e acometem principalmente pacientes imunocomprometidos, portadores do vírus HIV, transplantados ou com câncer. Os antifúngicos empregados no tratamento pertencem a poucos grupos de fármacos e o aparecimento de resistência antifúngica em muitos patógenos leva à necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. As cepas *Trichosporon japonicum* QU139 e *Candida catenulata* LV102 apresentam atividade *killer* sobre diversas leveduras patogênicas, apresentando bom potencial para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. O objetivo do trabalho foi a otimização das condições para produção e detecção dos compostos antimicrobianos, para seu futuro uso terapêutico, e sua purificação. O efeito *killer* da cepa *T. japonicum* QU139 foi avaliado pelo método dos poços contra células sensíveis de *Cryptococcus gattii* C20 nos meios GYP, YM e Queijo em diferentes pH e temperaturas. A máxima atividade *killer* foi encontrada no meio GYP, pH 4,5 à 25°C após 24 horas de incubação para *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102. Não foi possível isolar o composto antimicrobiano produzido pela levedura *T. japonicum* QU139 pelos métodos de isolamento de proteína/glicoproteína, corroborando a hipótese de que a toxina seja um glicolípido.

Palavras chave: *Candida catenulata*, *Cryptococcus gattii*, leveduras *killer*, potencial biotecnológico, *Trichosporon japonicum*.

¹Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (57 p). Fevereiro, 2010.

OPTIMIZATION OF PRODUCTION AND PURIFICATION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM YEAST FOR THE DEVELOPMENT OF A NEW ANTIFUNGAL AGENT

Author: Luciana Senter
Advisor: Dr. Patrícia Valente

²ABSTRACT

Human fungal infections have increased in the last years and affect mainly immunocompromised patients, carriers of HIV vírus, transplanted or with cancer. The antifungal agents used in treatment belong to a few groups of drugs and the increase of antifungal resistance in many pathogens leads to the necessity of developing new antifungal agents. Strains *Trichosporon japonicum* QU139 and *Candida catenulata* LV102 showed killer activity against several pathogenic yeasts, having a good potential for the development of new antimicrobial agents. The objective of the work was the optimization of conditions for production and detection of the antimicrobial compounds, aiming their future therapeutic use, and their purification. The killer effect of *T. japonicum* QU139 strain was evaluated by the well method against sensitive cells of *Cryptococcus gattii* C20 in media GYP, YM and Cheese in different pH and temperatures. The maximum killer activity was found in media GYP, pH 4.5, 25°C after 24 hours of incubation for *T. japonicum* QU139 and *C. catenulata* LV102. The isolation of the antimicrobial compound produced by the yeast *T. japonicum* QU139 was not possible by the methods for isolation of proteins/glicoproteins, corroborating the hypothesis that the toxin is a glycolipid.

Key-words: *Trichosporon japonicum*, *Candida catenulata*, *Cryptococcus neoformans*, killer yeasts, biotechnological potential.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (57 p). February, 2010.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VIII
RELAÇÃO DE TABELAS	XI
RELAÇÃO DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Drogas antifúngicas	5
2.2 Resistência às drogas antifúngicas	8
2.3 Criptococose	9
2.4 <i>Cryptococcus</i>	10
2.5 Leveduras	11
2.6 Leveduras produtoras de compostos antimicrobianos	11
2.7 Compostos antimicrobianos produzidos por leveduras	12
2.7.1 Glicoproteínas	13
2.7.1.1 Principais toxinas killer descritas e modo de ação	13
2.7.2 Glicolipídeos	20
2.7.2.1 Modo de ação dos glicolipídeos	21
2.8 Aplicação biotecnológica dos compostos antimicrobianos de leveduras	22

3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Culturas de leveduras produtoras de compostos antimicrobianos	25
3.2 Cultura da cepa sensível	25
3.3 Teste <i>killer</i>	26
3.4 Teste piloto	26
3.5 Otimização de pH, meios de cultivo e temperatura para produção de compostos antimicrobianos	27
3.6 Monitoramento de células viáveis	27
3.7 Concentração de proteínas / glicoproteínas	28
3.7.1 Precipitação com Sulfato de Amônio	28
3.7.2 Precipitação com Etanol.....	29
3.7.3 Ultrafiltração	30
3.7.4 Liofilização	30
3.8 Teste co-cultivo	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Teste piloto	31
4.2 Otimização de pH, meios de cultivo e temperatura para produção de compostos antimicrobianos	32
4.2 Monitoramento de células viáveis	33
4.3 Concentração de proteínas / glicoproteínas	34
4.3 Co-cultivo	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

8. REFERÊNCIAS	45
9. VITA.....	54

RELAÇÃO DE TABELAS

- TABELA 1. Diâmetros dos halos (mm) produzidos pela levedura *T. japonicum* QU139 nos meios GYP; meio YM; e meio Queijo incubados a 25°C por até 48 horas.....31
- TABELA 2. Diâmetros dos halos (mm) produzidos pela levedura *T. japonicum* QU139 nos meios GYP e YM a 30°C por até 48 horas.....32
- TABELA 3. Diâmetros dos halos (mm) produzidos em menor tempo pelas leveduras *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV 102.....32
- TABELA 4. Taxa de crescimento específica e tempo de duração das fases *lag* e *log* de *Trichosporon japonicum* QU139 e *Candida catenulata* LV 102 no meio GYP.....33

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1. Ação *killer* de *Candida catenulata* LV102 sobre a cepa sensível *Cryptococcus gattii* C20. Fonte: Luciana Senter.....12
- FIGURA 2. Sistemas *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* e modos de ação. Adaptado de Magliani *et al.* (1997).....14
- FIGURA 3. Processamento da preprotoxina e secreção da toxina na via secretória da levedura. Adaptado de: Schmitt & Breinig (2006).....16
- FIGURA 4. Modo de ação das toxinas K1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Marquina *et al.*, (2002).....17
- FIGURA 5. Autoimunidade da toxina K28 de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Schmitt & Breining (2006).....18
- FIGURA 6. Celobiolipídeo extracelular de *Sympodiomyopsis paphiopedili* VMK Y-2817. Fonte: Golubev (2006).....21
- FIGURA 7. Curvas de crescimento de *Trichosporon japonicum* QU139 (A) e *Candida catenulata* LV102 (B) em meio GYP nos pH 4,0 (o); 4,5 (□); 5,0 (Δ); e 5,5 (×).....34
- FIGURA 8. Teste de atividade *killer* de *Candida catenulata* LV102 sobre a cepa sensível *Cryptococcus gattii* C20 após ultrafiltração. Fonte: Luciana Senter.....35

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus célsius

µL: microlitro

µm: micrometro

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AmB: anfotericina B

ATP: adenosina trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucléico

dsDNA: simples fita de DNA

dsRNA: dupla fita de RNA

h: hora

kDa: quilodaltons

M: molar

mL: mililitro

mm: milímetro

pH: logarítmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio em uma solução

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

x g: força gravitacional da Terra

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções fúngicas na população humana causadas por fungos patogênicos vem aumentando nos últimos anos especialmente devido ao elevado número de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplantados ou com câncer, contribuindo para o aumento assustador de casos de micoses severas que leva todos os anos muitos pacientes a óbito. Os agentes antifúngicos utilizados pertencem a poucos grupos de fármacos, sendo que existem relatos de resistência a muitos desses, enquanto outros apresentam alta toxicidade para o organismo do paciente, por vezes, agravando ainda mais o problema. Esses fatos levam à necessidade de desenvolvimento de novas terapias.

Leveduras basidiomicéticas capsuladas como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, causam uma doença chamada criptococose e têm se tornado uma das micoses mais comuns em pacientes imunocomprometidos. *C. neoformans* acomete mais facilmente pacientes imunocomprometidos, enquanto que *C. gattii* é responsável pela manifestação em

humanos e animais aparentemente imunocompetentes. *C. gattii* foi utilizada como cepa sensível neste trabalho.

Algumas leveduras possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de outras leveduras, e em alguns casos, de outros microrganismos eucarióticos e procarióticos, entretanto são imunes à ação de sua própria toxina. O fenômeno *killer*, como é conhecido, é uma forma de competição biológica, semelhante à produção de bacteriocinas em bactérias. Existem duas classes de compostos antimicrobianos extracelulares em leveduras: glicoproteínas e glicolipídeos. As glicoproteínas podem ter efeito fungicida ou fungistático e são chamadas de micocinas (toxinas *killer*) e vem sendo estudadas nos últimos 40 anos, entretanto, a atividade fungicida dos glicolipídeos extracelulares tem sido recentemente descoberta.

Diversos fatores influenciam a atividade dos compostos antimicrobianos produzidos pelas leveduras, entre eles podemos citar: 1) pH: a atividade *killer* é expressa em pH baixo, entre 3,0 e 6,0 com ótimo em torno de 4,5; 2) Temperatura: ótima em torno de 15-20°C sendo inativadas em temperaturas elevadas devido à natureza protéica da maioria das micocinas; 3) Presença de substâncias que aumentam o tamanho do halo como glicerol e NaCl; 4) Agitação: meios estáticos são mais favoráveis que meios mantidos sob agitação para estabilidade da toxina; 5) Quanto menos denso for o inóculo de células sensíveis, mais rápida é a percepção da atividade, especialmente quando esta foi baixa; 6) Meios ricos nutricionalmente à base de glicose, extrato de levedura e peptona,

associados com tampão citrato-fosfato favorecem a detecção da atividade de cepas mesmo que apresentem baixa atividade; 7) Uso de cepa sensível apropriada.

A produção de compostos antimicrobianos em leveduras é comum e já foi descrita em mais de cem espécies e vinte gêneros diferentes, entre elas, *Saccharomyces cerevisiae*, cuja atividade *killer* foi descrita por Bevan & Makower em 1963. Desde lá muito se tem conhecido sobre características moleculares dos compostos antimicrobianos produzidos, modos de ação e desenvolvimento de anticorpos monoclonais para produção de vacinas contra fungos. Anticorpos contra micocinas produzidas por *Pichia anomala* e *Williopsis saturnus* vem sendo exaustivamente estudados para desenvolvimento de vacinas antifúngicas.

O estudo dos sistemas *killer* tem contribuído para o conhecimento de estrutura e função de parede celular e do sistema de secreção. Além da área clínica, as glicoproteínas e glicolípídeos têm aplicabilidade na indústria de alimentos, especialmente em processos fermentativos e no biocontrole de doenças causadas em plantas e crustáceos. Por estas características apresentadas, os compostos antimicrobianos mostram-se com bom potencial para aplicação e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório, de 595 culturas de leveduras provenientes de diferentes substratos testadas para atividade inibitória contra fungos patogênicos ao homem, foram escolhidas 21 culturas com bom potencial. Essas 21 culturas foram testadas contra diversos fungos patogênicos, incluindo diferentes espécies de *Candida*, *Cryptococcus*

neoformans, *Cryptococcus gattii*, dermatófitos, *Sporothrix schenckii* (agente da esporotricose) e *Fonsecaea pedrosoi* (principal agente da cromoblastomicose). Com os resultados obtidos, as leveduras *Trichosporon japonicum* QU139 e *Candida catenulata* LV102 foram escolhidas para o desenvolvimento de um antifúngico de amplo espectro de ação.

Para dar continuidade a esta proposta, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- Padronizar as melhores condições de temperatura e pH para produção e detecção dos compostos antimicrobianos produzidos pelas cepas *C. catenulata* LV102 e *T. japonicum* QU139;
- Isolar e purificar o composto com atividade antifúngica produzido por *T. japonicum* QU139.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Drogas antifúngicas

As drogas antifúngicas usadas no tratamento clínico pertencem a poucos grupos de fármacos e muitos patógenos tem apresentado grande resistência a boa parte dessas drogas, principalmente após a década de 1970 (Ghannoum & Rice, 1999; Lupetti *et al.*, 2002; Kanafani & Perfect, 2008). *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* tem se manifestado com muita agressividade, especialmente em pacientes com sistema imunológico comprometido, como portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplantados e pacientes com câncer.

Os agentes e modo de ação das mais importantes drogas antifúngicas podem ser divididos em quatro classes: 1) polienos (anfotericina B [AmB] e suas formulações lipídicas): agem na alteração da função da membrana; 2) derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol): que inibem a lanosterol 14- α -desmetilase, uma enzima chave para biossíntese de ergosterol; 3) 5-flucitosina: inibidor da síntese de DNA e RNA; e 4) equinocandinas: inibidores da síntese de β -1,3-glicanas. O tratamento mais comum para infecções fúngicas é

baseado no uso de AmB, 5-flucitosina e fluconazol (Kabir *et al.*, 2010), entretanto essas drogas nem sempre são efetivas no tratamento de *C. albicans* e *C. neoformans*. O mecanismo de resistência aos antifúngicos tem sido pouco avaliado, quando comparado aos agentes antibacterianos, dificultando relacioná-los, pois o alvo de ação normalmente é diferente devido a estrutura de parede celular e membrana citoplasmática serem diferentes em procariotos e eucariotos (Ghannoum & Rice, 1999).

O polieno AmB é o padrão ouro das drogas antifúngicas sistêmicas. Todos os organismos susceptíveis aos polienos contêm esteróis na membrana citoplasmática da célula, como leveduras, algas e protozoários (Ghannoum & Rice, 1999). Sua associação às moléculas de ergosterol na membrana citoplasmática do fungo forma canais através dos quais há extravasamento de conteúdo citoplasmático do microrganismo, causando a sua morte. Entretanto, a interação entre AmB e a membrana da célula humana contendo colesterol, resulta no efeito tóxico da droga para os seres humanos. O principal impacto é a disfunção renal, dificultando a filtração pelo glomérulo, sendo o seu uso prolongado indesejável. A resistência aos polienos tem sido emergente, e está envolvida com a alteração da composição lipídica na membrana citoplasmática pela redução do conteúdo de ergosterol (Loeffler & Stevens, 2003;).

Os derivados azólicos, como o fluconazol, apresentam vantagens sobre os polienos pela possibilidade de administração oral do medicamento (Nagappan & Deresinski, 2007). Esses derivados atuam como inibidores de biossíntese de ergosterol, o mais prevalente esterol na membrana plasmática fúngica. A

resistência aos azóis é frequentemente descrita tanto em pacientes com AIDS quanto imunocompetentes (Loeffler & Stevens, 2003; Kanafani & Perfect, 2008).

Inibidor de síntese de DNA e RNA, a 5-fluorocitosina entra na célula por meio de uma permease, sendo depois convertida a 5-fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina desaminase. Após, a 5-FU é convertida em ácido 5-fluorouridílico (FUMP) pela UMP-pirofosforilase, que é fosforilado e incorporado no RNA, resultando na inibição da síntese protéica. As moléculas de 5-FU também são convertidas a monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um potente inibidor da timidilato sintase, interrompendo a síntese de DNA e divisão celular. Assim a flucitosina interfere no metabolismo das pirimidinas, DNA, RNA e síntese protéica (Ghannoum & Rice, 1999). É comum seu uso associado com AmB. O nível de resistência desse antifúngico é muito baixo (Perfect *et al.*, 2010).

A inibição de síntese de parede é ocasionada pelas equinocandinas, que são lipopeptídeos que causam uma inibição não competitiva da síntese de β -1,3-glicanas com efeitos secundários em outros constituintes, como aumento do conteúdo de quitina na parede celular e uma redução no conteúdo de ergosterol na membrana plasmática do fungo (Loeffler & Stevens, 2003). A caspofungina foi a primeira equinocandina licenciada para uso clínico em vários países, enquanto a micafungina e a anidulafungina são de uso menos difundido (Ikeda *et al.*, 2007). A micafungina é eficaz até mesmo contra isolados resistentes a polienos e azólicos (Wiederhold & Lewis, 2007).

2.2 Resistência às drogas antifúngicas

As taxas de prevalência de micoses na população brasileira vêm aumentando consideravelmente, mesmo entre as micoses consideradas não ameaçadoras para a vida, como as causadas por dermatófitos e outras micoses superficiais (Brilhante *et al.*, 2005; Roselino *et al.*, 2008; Godoy-Martinez *et al.*, 2009). Micoses invasivas, como histoplasmose e paracoccidiodomicose, possuem altas taxas de mortalidade e de morbidade, existindo vários estudos epidemiológicos realizados no Brasil (Coutinho *et al.*, 2002; Bittencourt *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Ferreira, 2009). Nas últimas décadas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* tem se tornado mais virulentas ou resistentes às drogas aumentando o número de casos, muitos dos quais seguidos de óbito. (Moreira *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2009; Perfect *et al.*, 2010).

Resistência clínica é definida como falha na erradicação da infecção fúngica após a administração de agente antifúngico com atividade *in vitro* contra o organismo (Kanafani & Perfect, 2008). O uso extensivo de alguns antifúngicos tem provocado aparecimento de resistência em isolados clínicos e alertado para a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (Metwally *et al.*, 2007; Pasqualotto & Denning, 2007). Alves *et al.* (2006), estudando isolados clínicos de *Candida* spp., relataram susceptibilidade diminuída e resistência a fluconazol. Apesar da resistência aos compostos azólicos de linhagens de *Candida* isoladas de sangue em hospitais de São Paulo ter sido baixa, houve uma

taxa de mortalidade de 61% e tendência a aumento de resistência entre cepas de *Candida rugosa* (Colombo *et al.*, 2007; da Matta *et al.*, 2007).

Agravando ainda mais o problema da resistência aos agentes antifúngicos, novas espécies de fungos têm sido relatadas como causadoras de micoses, como cepas ambientais pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, causadoras de fungemias e com resistência intrínseca a triazóis e equinocandinas (Lunardi *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2009). Khan *et al.* (2007), por exemplo, relataram uma fungemia em neonatos causada por *Candida haemulonii*, resistente a AmB, fluconazol e itraconazol. Além disso, a terapia com um determinado antifúngico pode levar ao aparecimento de infecção secundária por uma espécie resistente ao agente utilizado (Petrikkos & Skiada, 2007).

2.3 Criptococose

A criptococose é uma das micoses pulmonar e meningocócica de ocorrência mais frequente no mundo. A doença ocorre preferencialmente em pacientes imunodeprimidos, com algum fator de predisposição, como transplantados, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pacientes com câncer, acometendo principalmente o sistema nervoso central (Moreira *et al.*, 2006; Severo *et al.*, 2009). Depois do início do uso das terapias antiretrovirais em pacientes HIV positivos, a incidência de criptococose diminuiu significativamente, entretanto, em pacientes não infectados a incidência não mudou nesse período.

Em países desenvolvidos, a doença não desapareceu pois o grupo de alto risco continuou crescendo pelo avanço da medicina em transplantes e criação de novas terapias imunossupressivas (Severo *et al.*, 2009).

Os agentes causadores da doença são *C. neoformans* e *C. gattii*. O último geralmente acomete animais e humanos aparentemente imunocompetentes, entretanto há relatos de infecção de pacientes portadores de AIDS, que é mais comum para *C. neoformans* (Perfect *et al.*, 2010).

2.4 *Cryptococcus*

C. neoformans / *C. gattii* são leveduras basidiomicéticas capsuladas, que formam um complexo de espécies patogênicas subdividido em sorotipos, incluído *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e var. *neoformans* (sorotipo D), e *C. gattii* (sorotipos B e C), de acordo com a especificidade antigênica do polissacarídeo capsular (Severo *et al.*, 2009; Springer & Chaturvedi, 2010). Este gênero é frequentemente relacionado com aves domésticas (Costa *et al.*, 2009) e mais de cinquenta espécies de árvores, ocorrendo em regiões de climas tropicais e temperados, inclusive no Brasil (Khan *et al.*, 2007; Trilles *et al.*, 2008; Springer & Chaturvedi, 2010).

A virulência do gênero *Cryptococcus* está associada com a produção de oxidases e proteases, bem como propriedades antifagocitárias da cápsula polissacarídea. A infecção é causada pela inalação de *Cryptococcus* spp., que pode causar uma infecção pulmonar assintomática, sendo que as leveduras se mantêm num estado latente, e em eventos subsequentes de imunossupressão,

são reativadas e causam a doença (Severo *et al.*, 2009). A levedura possui um tropismo pelo Sistema Nervoso Central, devido às concentrações ótimas de nutrientes (tiamina, glutamina, ácido glutâmico, dopamina, carboidratos e minerais) que podem ser assimiláveis por fungos (Severo *et al.*, 2009).

2.5 Leveduras

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucariotos unicelulares pertencentes ao Reino *Fungi*, apresentando características típicas de fungos como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, aclorofiladas, nutrição heterotrófica por absorção de nutrientes, reprodução assexuada por brotamento ou fissão binária, não formando corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Este grupo está relacionado aos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos, que são aqueles sem reprodução sexuada definida (Hawkswort *et al.*, 1995). Geralmente são encontradas em ambientes terrestres, aquáticos e marinhos, na superfície de frutos, folhas e outros substratos contendo açúcares, frequentemente empregadas em processos industriais (Kurtzman & Fell, 1998).

2.6 Leveduras produtoras de compostos antimicrobianos

Leveduras *killer* produzem compostos capazes de inibir o crescimento de células sensíveis (Figura 1), mas são imunes a ação de suas próprias toxinas. São reconhecidos sistemas *killer* em diferentes leveduras, cada um com um modo

de ação diferente. Leveduras ascomicéticas, em geral, são insensíveis às micocinas produzidas por leveduras basidiomicéticas e vice-versa. Isso pode estar associado a características taxonômicas como formação de estrutura de parede celular (Golubev, 2006).



FIGURA 1. Ação *killer* de *Candida catenulata* LV102 sobre a cepa sensível *Cryptococcus gattii* C20. Fonte: Luciana Senter

2.7 Compostos antimicrobianos produzidos por leveduras

A produção de compostos antimicrobianos não é exclusiva de leveduras. De 2000 a 2008, mais de 300 compostos antimicrobianos naturais tem sido relatados (Sallen *et al.*, 2010), dentre eles carotenóides e polipeptídeos, isolados de plantas e microrganismos, que apresentam ampla atividade antimicrobiana. Frequentemente são descritos novos compostos antimicrobianos ativos contra microrganismos para biocontrole em alimentos (Comitini *et al.*,

2004a, 2004b; Buzzini *et al.*, 2004), em plantas (Ávis & Bélanger, 2002; Santos & Marquina, 2004), em crustáceos (Wang *et al.*, 2007) e na área clínica (Polonelli *et al.*, 2003; Izgu *et al.*, 2006; Magliani *et al.*, 2008; Kabir *et al.*, 2009).

De acordo com Golubev (2006), são conhecidos dois grupos de compostos antimicrobianos produzidos por leveduras: glicoproteínas e glicolípídeos, com modos de ação diferentes e serão apresentados a seguir:

2.7.1 Glicoproteínas

A maioria das micocinas são proteínas ou glicoproteínas com massa molecular de 10-30 kDa, entretanto, algumas podem ser maiores, como as encontradas em *Pichia anomala* (47 kDa) e *Williopsis saturnus* (62 kDa) (Buzzini *et al.*, 2004; Golubev, 2006; Izgü *et al.*, 2006). As micocinas podem ser codificadas por genes nucleares ou pela associação de componentes RNA dupla fita (dsRNA) viral ou DNA plasmidial linear dupla fita (dsDNA). A transmissão do dsRNA pode ocorrer durante a divisão celular, esporogênese, ou fusão celular (Pintar & Starmer, 2003; Magliani *et al.* 1997; Schmitt & Breining, 2006).

2.7.1.1 Principais toxinas killer descritas e modo de ação

O fenótipo *killer* foi inicialmente descrito por Bevan & Makower (1963) em *S. cerevisiae* (Figura 2), que possui linhagens produtoras de toxina *killer* (K+), linhagens sensíveis (K- R-) e linhagens neutras, que não produzem a toxina e nem

são sensíveis (K- R+). Na espécie são descritos pelo menos três diferentes vírus dsRNA satélites (M1, M2 e M28) que codificam diferentes toxinas (K1, K2 e K28, respectivamente) e componentes de autoimunidade (Magliani *et al.*, 1997; Schmitt & Breining, 2006). O fenótipo requer a coexistência de dois diferentes vírus dsRNA, um vírus auxiliar (L-A) e um vírus codificante da toxina *killer* (M). *In vivo* não ocorrem os três vírus codificantes de toxinas *killer* (M1, M2 e M28), pois cepas produtoras da toxina K1 podem ser sensíveis às toxinas K2 e K28. Cada toxina é sintetizada como uma pré-toxina que sofrerá modificação pós-tradução, resultando na toxina ativa (Magliani *et al.* 1997).

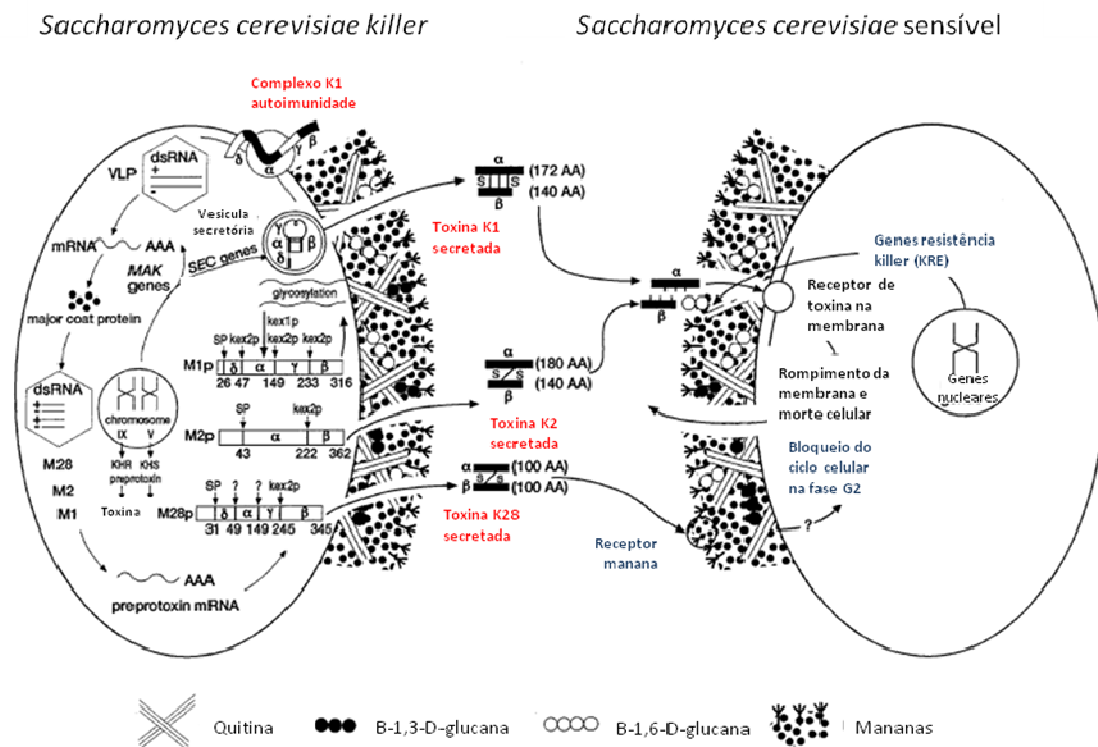


FIGURA 2. Sistemas *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* e modos de ação. Adaptado de Magliani *et al.* (1997).

A micocina mais conhecida e bem estudada é K1 (20kDa) de *S. cerevisiae* consistindo de dois polipeptídeos α e β ligados por pontes dissulfetos separadas por uma região γ , necessária para a maturação. A subunidade β é necessária para o reconhecimento e ancoramento na célula, enquanto a subunidade α age na membrana citoplasmática produzindo um gradiente de próton transmembrana (Magliani *et al.* 1997; Golubev, 2006).

Na toxina K28, após a tradução da preprotoxina codificada pelo vírus *killer* codificante (Figura 3), o precursor da toxina é transferido para o lúmen do Retículo Endoplasmático com o auxílio de chaperonas (*Ssa1p-Ssa4p*). Em seguida a toxina entra pelo poro (*Sec61p*) e ocorre uma clivagem na região pre. A protoxina dobra-se e é transferida ao Complexo de Golgi onde a subunidade γ é clivada pela endopeptidase *Kex2p*, restando apenas as subunidades α e β ligadas por pontes dissulfetos. A toxina enviada para a vesícula secretória é liberada para o meio extracelular, onde irá ligar-se aos receptores da célula sensível (Schmitt & Breinig, 2006).

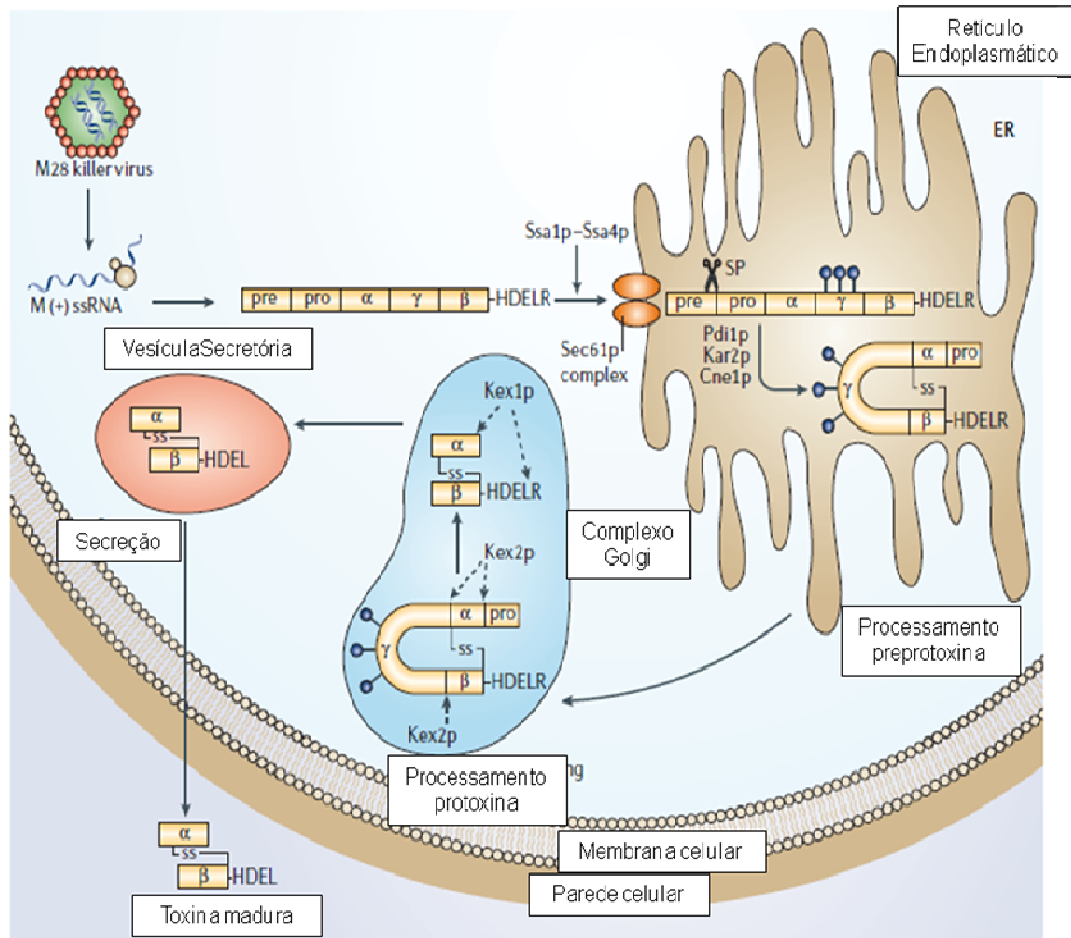


FIGURA 3. Processamento da preprotoxina e secreção da toxina na via secretória da levedura. Adaptado de: Schmitt & Breinig (2006).

A ação de K1, K2 e K28 ocorre em duas etapas: a primeira envolve um rápido encoramento da toxina na parede celular da célula receptora, sem gasto de energia. Em K1 e K2 o receptor primário é identificado como β -1,6-glicanas enquanto que K28 tem afinidade com α -1,3-mananoproteína. A segunda etapa envolve gasto de energia para translocação da toxina através da membrana citoplasmática e interação com o receptor secundário na membrana. Em K1, o receptor foi identificado como *Kre1p*, uma proteína de superfície celular de levedura, também envolvida na biossíntese de β -1,6-glicana. Depois de ter

atravessado a membrana citoplasmática (Figura 4), a toxina K1 exerce seu efeito letal formando canais iônicos e rompendo a membrana citoplasmática (Magliani et al. 1997; Schmitt & Breining, 2002). K28 entra no citoplasma por endocitose e percorre a via de secreção no sentido inverso (Via Golgi e Retículo Endoplasmático), entra no citossol e traduz o sinal tóxico no núcleo da levedura, inibindo a síntese de DNA no ciclo celular na fase G1/S.

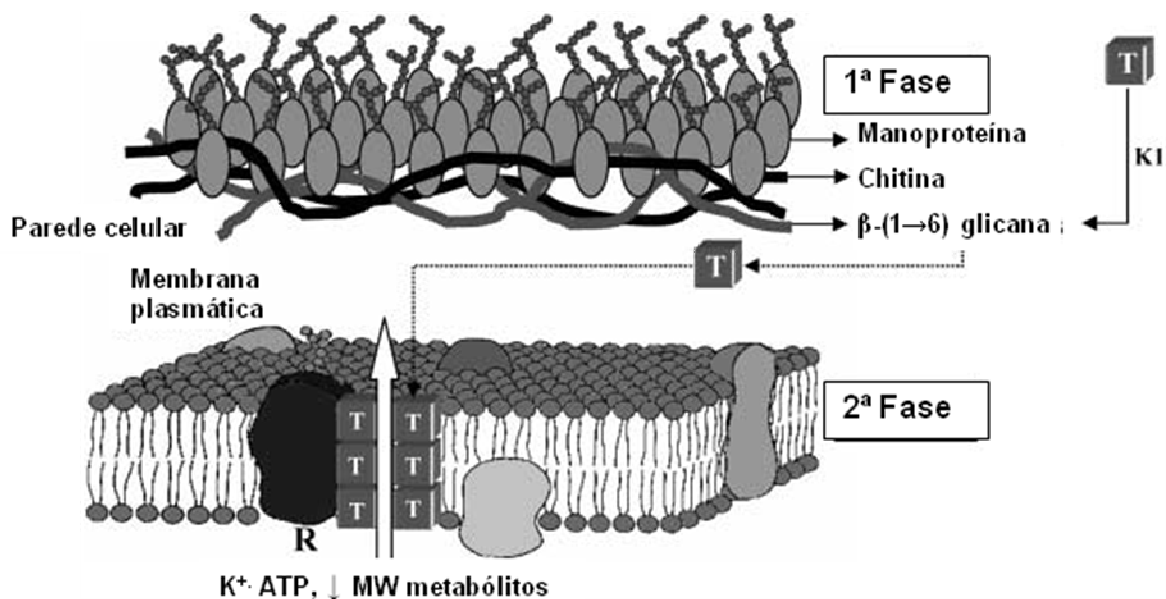


FIGURA 4. Modo de ação das toxinas K1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Marquina *et al.* (2002).

A imunidade do fenótipo *killer* é essencial para a sobrevivência já que as toxinas agem na inibição das funções de células eucarióticas. A imunidade para cada toxina é diferente. Para K1, a interação do receptor R2 (*Kre1p*) com a pró-toxina durante a secreção, leva ao desvio do complexo receptor - pró-toxina para o vacúolo. O receptor de membrana para K1 (*Kre1p*), uma proteína de superfície celular, está envolvido na síntese de componentes de parede celular β -1,6-

glicana. Entretanto a imunidade aparentemente não envolve a diminuição de receptores na membrana, mas afeta a etapa de ligação do *Kre1p* (Schmitt & Breinig, 2006). Para K28, a toxina madura α/β é re-internalizada e transportada de modo inverso na via secretória. A subunidade β é rapidamente degradada pelo proteossoma (Figura 5). Parte do precursor é desviado e não ubiquitinizado nem degradado e pode servir como molde para preprotoxina no Retículo endoplasmático e a secreção da toxina ou como componente de imunidade para formar um complexo com a toxina α/β reinternalizada.

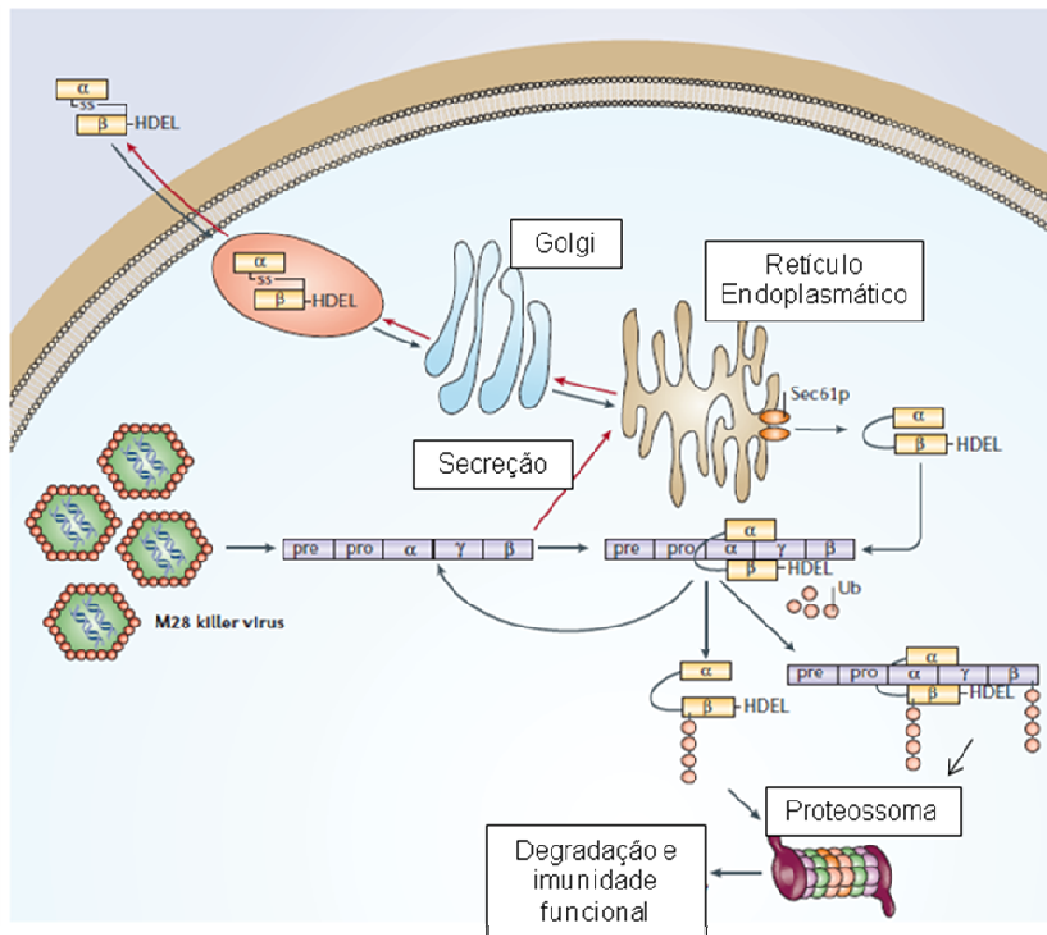


FIGURA 5. Autoimunidade da toxina K28 de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Schmitt & Breining (2006).

Outro sistema *killer* conhecido é de *Ustilago maydis*, codificado por dsRNA, composto por subunidades KP1, KP4 e KP6 que podem atingir células da mesma espécie ou relacionadas. Seu modo de ação é ainda não está claro. Em *Kluyveromyces lactis* a toxina é ainda codificada por plasmídeos de DNA lineares, agindo no ciclo celular. Em *Pichia* e *Williopsis*, pode estar associada ao cromossomo ou plasmídeo de dsDNA e causa lise osmótica. Outros sistemas *killer* são conhecidos formando associação viral em *Hanseniaspora uvarum* e *Zygosaccharomyces bailii*, e com características cromossômicas em *Candida* e *Cryptococcus* (Magliani *et al.*, 1997; Golubev, 2006).

Outro exemplo de sistema *killer* é o de *Pichia anomala*. Essa levedura produz uma toxina conhecida como PaKT, que atua interferindo com as β -glicanas na parede celular, porém o mecanismo exato de ação continua não identificado (Cenci *et al.*, 2004). A PaKT tem atividade contra vários fungos patogênicos do homem, incluindo *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis jirovesii* (Cenci *et al.*, 2004; Seguy *et al.*, 1996, 1998). Recentemente, foi relatado que a cepa NCYC 434 de *P. anomala* produz uma outra toxina *killer*, denominada panomicocina. A panomicocina é uma glicoproteína monomérica com atividade de exo- β -1,3-glicanase e é altamente estável em pH entre 3 e 5,5 e temperaturas de até 37^o C. A hidrólise da β -1,3-glicana resulta em dano na parede celular e conseqüente morte do fungo sensível (Izgu *et al.*, 2006). Diferente do que é normalmente relatado para a maioria das micocinas, algumas apresentam alta termoestabilidade e tolerância a uma ampla faixa de pH, como as produzidas por

Pichia e *Williopsis*, devido ao grande número de pontes dissulfeto nas moléculas ricas em cisteína (Golubev, 2006; Kabir *et al.*, 2009).

2.7.2 Glicolípídeos

Enquanto a micocigenia (efeito inibitório de glicoproteínas) foi descoberta em 1963 por Bevan & Makower, o efeito inibitório dos glicolípídeos foi descoberto trinta anos mais tarde por Golubev (1992). Os glicolípídios são toxinas com uma porção lipídica ligada ao radical glicosídico (Figura 6), sendo consideradas como agentes emulsificantes com poder antimicrobiano, apresentando máxima atividade em pH ácido, estabilidade térmica e baixa toxicidade para células animais (Puchkov *et al.*, 2002; Golubev *et al.*, 2002; Golubev *et al.*, 2004; Golubev, 2006, Mimee *et al.*, 2009; Kulakowskaya *et al.*, 2010). Usualmente, os glicolípídeos são celobiolípídeos, contendo celobiose na porção glicosídica.

A produção de glicolípídeos requer um meio mínimo com alta concentração de carboidratos e baixo conteúdo de fonte de nitrogênio. A presença de extrato de levedura (fonte nitrogenada) estimula a produção de biomassa e sua ausência estimula a produção de floculosina, um glicolípídeo extracelular produzido por *Pseudozyma flocculosa*. O completo consumo da fonte de carbono acarreta na diminuição imediata da produção de floculosina. Isso sugere que o

fungo seja capaz de catabolizar a celobiose lipídica durante o período de escassez nutricional (Mimee *et al.*, 2009).

Glicolipídeos extracelulares com função antimicrobiana tem sido relatados em algumas espécies, como *Ustilago maydis*, *Cryptococcus humicola*, *Sympodiomyopsis paphiopedili*, *Pseudozyma fuziformata*, *Pseudozyma flocculosa* e *Trichosporon porosum* (Golubev *et al.*, 2004; Kulakowskaya *et al.*, 2003; Mimee *et al.*, 2009; Kulakowskaya *et al.*, 2009, 2010) e apresentam atividade inibitória contra um grande número de cepas sensíveis.

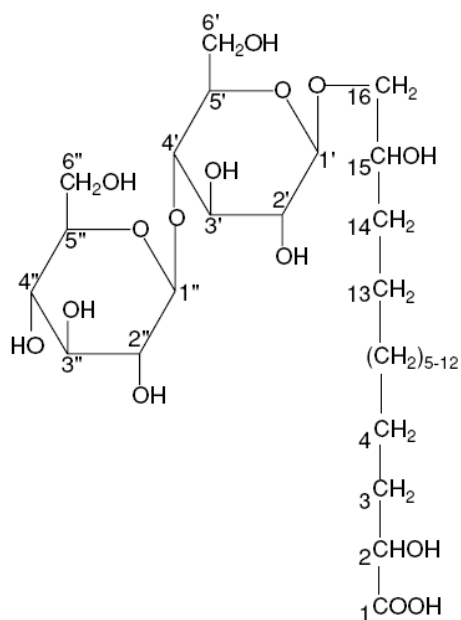


FIGURA 6. Celbiolipídeo extracelular de *Sympodiomyopsis paphiopedili* VMK Y-2817. Fonte: Golubev (2006).

2.7.2.1 Modo de ação dos glicolipídeos

Os celbiolipídeos aumentam a permeabilidade não seletiva da membrana citoplasmática. Células sensíveis a celbiolipídeos mostram uma perda

de compostos intracelulares, incluindo eletrólitos e ATP. Os celobiolipídeos podem se intercalar na matriz lipídica alterando a integridade da membrana, causando desintegração celular e eventualmente morte (Golubev, 2006). A diferença na composição dos lipídeos da membrana citoplasmática influencia no nível de sensibilidade aos celobiolipídeos. A síntese de glicolipídeos extracelulares provavelmente é controlada por genes cromossômicos, já que não tem sido relatada presença de dsRNA ou DNA plasmidial em nenhuma espécie que secreta celobiolipídeos.

2.8 Aplicação biotecnológica dos compostos antimicrobianos de leveduras

Como visto acima, os compostos antimicrobianos de leveduras já foram testados contra fungos patogênicos humanos, demonstrando o potencial das mesmas para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Entretanto, as micocinas não podem ser usadas oral ou intravenosamente por serem sensíveis a proteases, antigênicas, inativadas a 37 °C e não estáveis no pH humano (Magliani *et al.*, 1997; Polonelli *et al.*, 2003; Golubev, 2006), portanto, não podem ser diretamente utilizadas como agentes terapêuticos, ficando restritas ao uso tópico.

O potencial de utilização terapêutica das toxinas *killer* foi ampliado pelo uso das redes idiotípicas. Em linhas gerais, o desenvolvimento de um novo agente antifúngico baseado nessas toxinas começa com a obtenção de anticorpos monoclonais capazes de neutralizar a ação da toxina *in vitro*. Esses anticorpos são obtidos pela técnica de hibridoma com camundongos imunizados com a toxina e são posteriormente usados na vacinação idiotípica de outros camundongos,

gerando anticorpos anti-idiotípicos e resultando na proteção desses camundongos contra desafios com microrganismos patogênicos. Os anticorpos anti-idiotípicos gerados a partir de anticorpos capazes de neutralizar a atividade da toxina são, em teoria, cópias do sítio ativo da mesma.

Os anticorpos gerados podem ser policlonais, monoclonais ou recombinantes, podendo ser IgA, IgG ou IgM. Além disso, pode-se obter derivados sintéticos dos anticorpos anti-idiotípicos, denominados mimótopos, com atividade protetora (Magliani *et al.*, 2004). Anticorpos anti-idiotípicos já foram obtidos utilizando a toxina HM-1 de *W. saturnus* var. *mrakii* (Selvakumar *et al.*, 2006), apresentando estabilidade numa ampla faixa de pH (2 a 11) e tratamento térmico, altamente efetivo como agente antifúngico (Kabir *et al.*, 2009; Krishnaswamy *et al.*, 2010), e a toxina PaKT de *P. anomala* (Magliani *et al.*, 2004).

A vacinação de camundongos com um anticorpo monoclonal contra a toxina *killer* de *P. anomala* (PaKT) conferiu proteção significativa contra desafios intravenosos com *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1993). A vacinação intravaginal de ratos levou à produção de anticorpos anti-idiotípicos naturais no fluido vaginal, conferindo proteção à mucosa contra desafio com *C. albicans* num modelo de candidíase vaginal (Polonelli *et al.*, 1994). Outros fungos que já foram inibidos *in vivo* com a utilização de anticorpos anti-idiotípicos e mimótopos sintéticos foram *Aspergillus fumigatus*, *P. jirovesii*, *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Magliani *et al.*, 2004).

Uma outra abordagem para otimização da atividade fungicida das toxinas *killer* foi utilizada por Bracesco *et al.* (2006). Esses autores, trabalhando com as toxinas K1 e K2 de *S. cerevisiae*, obtiveram um fator fungicida estável (SKF), com maior espectro de ação e atividade em amplas faixas de pH e temperatura. Para tanto, foram alteradas propriedades físico-químicas com adição de EDTA, um quelante de metais. Isto também aumentou a estabilidade durante a estocagem a baixas temperaturas.

Na linha do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, vem a pesquisa dos compostos antimicrobianos produzidos por leveduras, capazes de inibir fungos e outros microrganismos sensíveis como será destacado a seguir.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Culturas de leveduras produtoras de compostos antimicrobianos

As culturas de leveduras produtoras de compostos antimicrobianos utilizadas, *Candida catenulata* LV102 e *Trichosporon japonicum* QU139, foram originalmente isoladas de leite de vaca e queijo, respectivamente, comercializados no Rio Grande do Sul (Spanemberg *et al.* 2004; Landell *et al.* 2006), e estão depositadas na Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS. Todas as culturas estão conservadas a 4°C em Ágar GYP (Anexo 1) inclinado, coberto com óleo mineral estéril.

3.2 Cultura da cepa sensível

A cepa sensível *Cryptococcus gattii* C20 (HSL3), isolado clínico do Hospital São Lucas de Porto Alegre de paciente HIV⁺, sorotipo B, tipo molecular VGIII, *mating type* α , foi utilizada nos ensaios, gentilmente cedida pela Dra. Marilene Henning Vainstein.

3.3 Teste *killer*

O teste *killer*, ou teste dos poços, foi realizado de acordo com Woods & Bevan (1968). Retirou-se 30 μ L de cada cultivo do respectivo tempo de incubação, que foram inoculados em poços (9mm de diâmetro) de uma placa de Petri contendo os respectivos meio e pH, previamente inoculada com 10³ células sensíveis de *C. gattii* C20. Mensurou-se a atividade *killer* pelo diâmetro (mm) da zona clara de inibição entorno do poço depois da incubação a 48 h a 25°C, sendo definida a média das zonas de inibição das triplicatas dos poços de dois experimentos distintos.

3.4 Teste piloto

Realizou-se um experimento piloto para definir quais meios e pH são mais favoráveis para produção e detecção da toxina *killer* de *T. japonicum* QU139, com os meios GYP, YM e Queijo (anexo 1) tamponados com tampão citrato-fosfato 0,05M em diferentes pH (3,0; 4,0; 5,0; e 6,0) na temperatura de 25°C. Aproximadamente 10³ células de *T. japonicum* QU139 foram inoculadas em frascos de 250mL contendo 100mL dos meios testados, incubados a 25°C com 80 rpm, a 16, 24, 40 e 48 horas de incubação e realizado teste *killer* pelo método dos poços, conforme descrito no item 3.3, contra 10⁵ células sensíveis de *C. gattii* C20.

Definido o meio e pH mais indicado para a produção do composto antimicrobiano, foi avaliada a alteração da temperatura de incubação de 25 °C para 30°C.

3.5 Otimização de pH, meios de cultivo e temperatura para produção de compostos antimicrobianos

Com as condições mais indicadas de meio, pH e temperatura pelo experimento piloto, foram realizados experimentos com as leveduras *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102 em meio GYP nos pH 4,0; 4,5; 5,0; e 5,5 tamponados com tampão citrato-fosfato 0,05M. Aproximadamente 10^3 células das leveduras produtoras do composto antimicrobiano foram inoculadas em frascos de 250mL contendo 100mL de caldo GYP, incubados a 25°C com 150 rpm, por até 48 horas de incubação. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método dos poços, agora contra 10^3 células sensíveis de *C. gattii* C20, conforme descrito acima, em intervalos de seis em seis horas, contando-se do momento de inoculação.

3.6 Monitoramento de células viáveis

Paralelamente ao teste de produção e detecção dos compostos antimicrobianos produzidos pelas leveduras estudadas, realizou-se o monitoramento de células viáveis retirando-se alíquotas de 100µL em cada tempo para contagem em meio GYP. O número de gerações e a taxa de crescimento específico foram calculados segundo as fórmulas abaixo:

$$N = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

$$\mu = \frac{N}{T}$$

Onde:

N: Número de gerações da levedura

log N_t: log do número de células no tempo final da fase log

log N₀: log do número de células no tempo inicial da fase log

μ: taxa de crescimento específico

T= Tempo de duração da fase log

Todos os dados numéricos representam a média de dois experimentos distintos.

3.7 Concentração de proteínas / glicoproteínas

As metodologias empregadas para concentração do composto antimicrobiano da levedura *T. japonicum* QU139 como possível peptídeo protéico foram realizadas de acordo com Scopes (1994), Santos & Marquina (2004), Buzzini *et al.* (2004) e Comitini *et al.* (2004a): precipitação com sulfato de amônio, precipitação com etanol, ultrafiltração e liofilização, descritas a seguir.

3.7.1 Precipitação com Sulfato de Amônio

O sobrenadante do cultivo de 100 mL de *T. japonicum* QU139 em meio GYP, pH 4,5 foi precipitado com sulfato de amônio em quatro faixas de saturação (0-20%; 20-40%; 40-65%; e 65-80%). O experimento foi conduzido sob condições

de refrigeração e agitação. A quantidade de sal necessária para atingir cada faixa de saturação foi calculada com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação segundo Scopes (1994). Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para a etapa de precipitação, a suspensão foi mantida por 30 minutos sob agitação e, após, mais 30 minutos em repouso sob refrigeração. Então esta suspensão foi centrifugada ($10.000 \times g$ por 15 min), e o precipitado foi ressuspendido em 2 ml de tampão citrato-fosfato (0,05M pH 4,5). A amostra ressuspendida foi então dialisada contra o mesmo tampão *overnight*. Após o processo, inoculou-se 30 μ L em cada poço da placa previamente inoculada com a cepa sensível para verificação da ação do produto obtido através do método dos poços.

3.7.2 Precipitação com Etanol

Um litro do cultivo de *T. japonicum* QU139 nas condições citadas em 3.7.1 foi centrifugado e filtrado (0,45 μ m - MILIPORE), posteriormente precipitado com 70% do volume de etanol, e mantido a 4°C *overnight*. Após centrifugação 25 min a $3.000 \times g$, o precipitado foi suspendido em 50mL de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 4,5 e realizado o teste dos poços.

3.7.3 Ultrafiltração

O protocolo de ultrafiltração foi adaptado de Comitini *et al.* (2004a), onde 100mL de cultivo foi filtrado-esterilizado em membrana com poro 0,45µm, concentrado para um volume final de 2mL em filtro Amicon YM10 (10kD *cut-off*), mantido a 4°C e testado pelo método dos poços.

3.7.4 Liofilização

O cultivo de células incubadas nas condições citadas em 3.7.1 foi filtrado e liofilizado por cinco dias. O produto liofilizado foi suspenso em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH 4,5 e testado pelo método dos poços conforme descrito acima.

3.8 Teste co-cultivo

Um cultivo de 10^3 células sensíveis de *C. gattii* C20 em 10 ml de meio GYP inativado foi adicionado ao cultivo de 100 mL de *T. japonicum* QU139 no mesmo meio, pH 4,5 com agitação de 150 rpm por 24 h para saber se a cepa *killer* necessitava de estímulo externo para produção do composto antimicrobiano. O co-cultivo foi filtrado-esterilizado em membrana com poro 0,45µm (Milipore), e analisado pelo teste dos poços.

4. RESULTADOS

4.1 Teste piloto

O experimento piloto da padronização dos meios e pH demonstra que os meios GYP e YM nos pH 4,0 e 5,0 proporcionaram os maiores halos (mm) produzidos pela levedura *T. japonicum* QU139 (Tabela 1) a 25°C em menor tempo de incubação. Estas condições foram testadas a 30°C em pH 4,5 para verificar o comportamento da produção e detecção dos compostos antimicrobianos, porém os diâmetros dos halos foram inferiores aos obtidos a 25°C (Tabela 2).

TABELA 1. Diâmetros dos halos (mm) produzidos pela levedura *T. japonicum* QU139 nos meios GYP; meio YM; e meio Queijo incubados a 25°C por até 48 horas.

	GYP				YM				Queijo			
	16h	24h	40h	48h	16h	24h	40h	48h	16h	24h	40h	48h
pH 3,0	0	0	17	17	15	22	0	0	*	*	*	*
pH 4,0	18	20	27	24	15	22	27	18	14	14	20	21
pH 5,0	20	21	25	27	16	22	26	20	14	14	15	22
pH 6,0	18	20	24	23	15	22	26	20	14	14	15	21

* O pH 3,0 não foi testado para o meio queijo por apresentar halos menores que os outros pH nos meios GYP e YM ou serem inexistentes.

TABELA 2. Diâmetros dos halos (mm) produzidos pela levedura *T. japonicum* QU139 nos meios GYP e YM a 30°C por até 48 horas.

Meios	pH 4,5 / 30°C			
	16h	24h	40h	48h
GYP	19	20	18	11
YM	20	20	18	14

4.2 Otimização de pH, meios de cultivo e temperatura para produção de compostos antimicrobianos

Os resultados da otimização de pH em meio GYP demonstram que tanto para a cepa *T. japonicum* QU139 como para *C. catenulata* LV102, os maiores halos produzidos em menor tempo de incubação, ocorreram a 24 horas em pH 4,5 (Tabela 3).

TABELA 3. Diâmetros dos halos (mm) produzidos em menor tempo pelas leveduras *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV 102.

pH	LV 102								QU139							
	6h	12h	18h	24h	30h	36h	42h	48h	6h	12h	18h	24h	30h	36h	42h	48h
pH 4,0	16*	18	17	24	26	27	27	26	**	**	**	29	24	25	27	24
pH 4,5	16	22	22	29	27	28	26	27	**	**	**	32	26	26	26	26
pH 5,0	18	19	23	27	29	29	28	27	**	**	**	32	24	22	22	23
pH 5,5	18	22	23	25	26	27	22	26	**	**	**	24	21	21	22	19

* Dados são médias das triplicatas

** Dados não mensurados

4.2 Monitoramento de células viáveis

Juntamente com a verificação da produção de compostos antimicrobianos pelas duas leveduras estudadas, traçou-se uma curva de crescimento para cada levedura, que pode ser vista nas figuras 7A e 7B, enquanto a taxa de crescimento específico e o tempo de duração das fases *lag* e *log* de crescimento estão demonstrados na tabela 4.

TABELA 4. Taxa de crescimento específica e tempo de duração das fases *lag* e *log* de *Trichosporon japonicum* QU139 e *Candida catenulata* LV 102 no meio GYP.

Taxa de crescimento específico, μ (h^{-1})			LV102		QU139	
			Tempo duração fase (horas)			
	LV102	QU139	<i>lag</i>	<i>log</i>	<i>lag</i>	<i>log</i>
pH 4,0	0,67	0,87	6	30	12	12
pH 4,5	0,58	0,66	6	18	6	18
pH 5,0	0,61	0,63	18	12	6	18
pH 5,5	0,58	0,36	18	18	6	30

A taxa de crescimento específico (μ) foi calculada a partir da razão do número de gerações pelo tempo de duração da fase *log*.

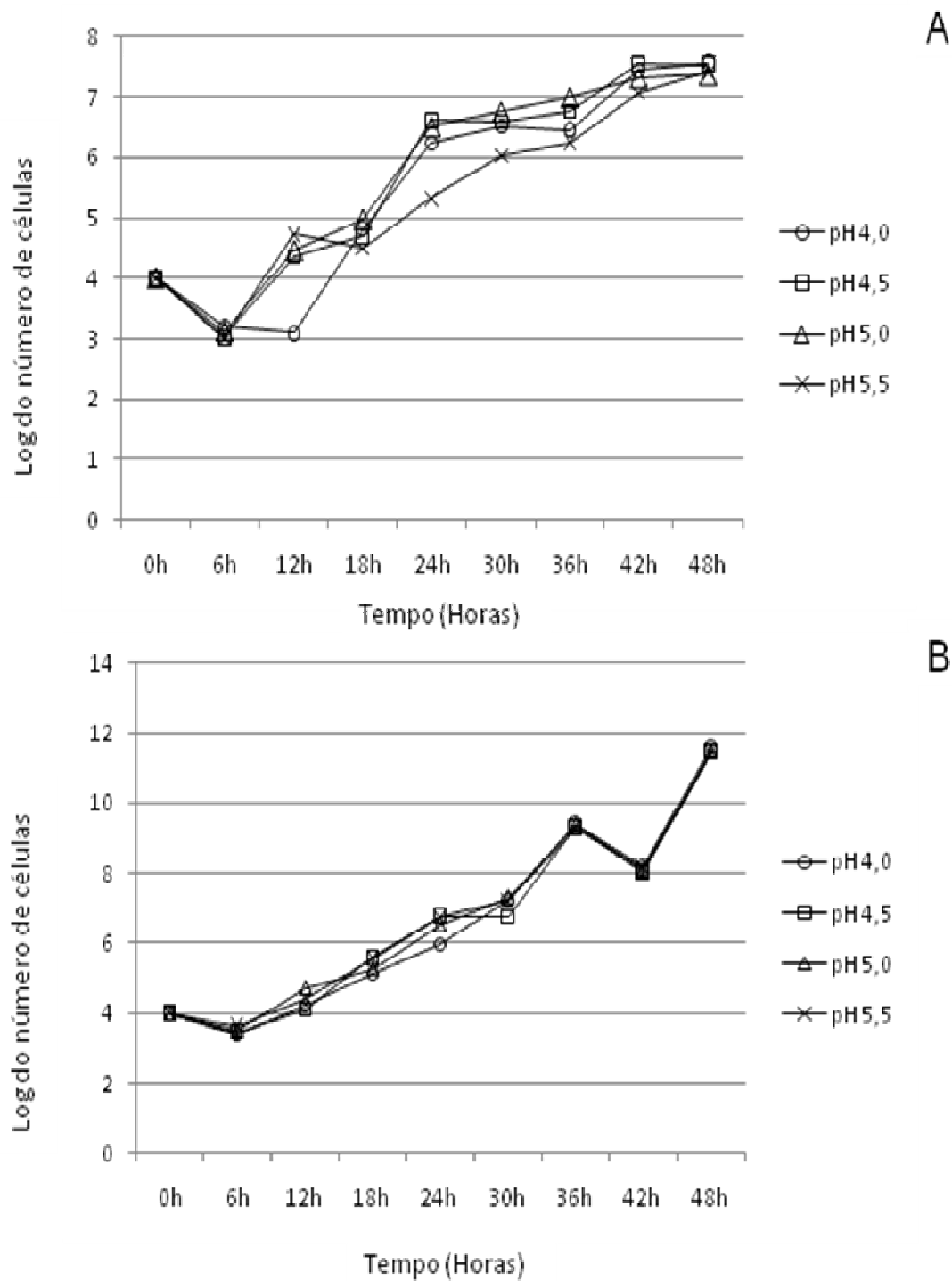


FIGURA 7. Curvas de crescimento de *Trichosporon japonicum* QU139 (A) e *Candida catenulata* LV102 (B) em meio GYP nos pH 4,0 (o); 4,5 (□); 5,0 (Δ); e 5,5 (×).

Os métodos de isolamento de proteínas seguidos pelos protocolos de Scopes (1994), Santos & Marquina (2004), Buzzini *et al.*, (2004) e Comitini *et al.* (2004a) tiveram resultados negativos quanto à atividade antimicrobiana (Figura 8). Os controles, realizados com os sobrenadantes dos cultivos contendo células, foram sempre capazes de produzir halos de inibição sobre a cepa sensível *C. gattii* C20.

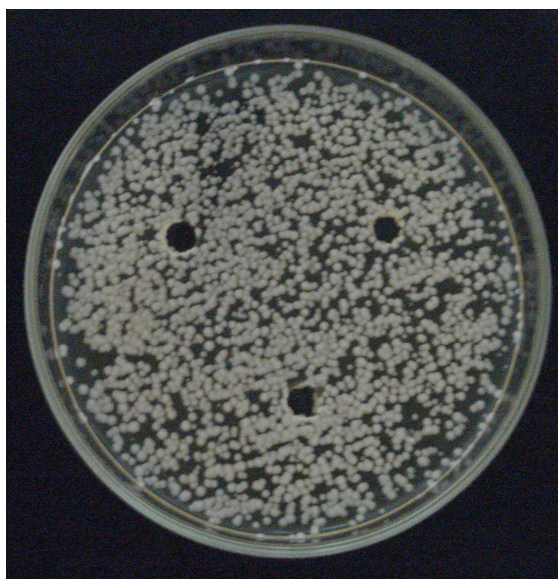


FIGURA 8. Teste de atividade *killer* de *Candida catenulata* LV102 sobre a cepa sensível *Cryptococcus gattii* C20 após ultrafiltração. Fonte: Luciana Senter

4.3 Co-cultivo

Devido ao fato dos resultados obtidos pelos protocolos de concentração de proteínas/glicoproteínas serem negativos, testou-se o co-cultivo de células *killer* e sensíveis, para saber se o composto antimicrobiano somente seria secretado no

ambiente com o estímulo da presença da célula sensível. Entretanto, o sobrenadante testado também não teve atividade sobre a cepa sensível testada.

5. DISCUSSÃO

Muitos fatores podem influenciar na atividade de compostos antimicrobianos produzidos por leveduras, como pH, temperatura e composição do meio. Normalmente são utilizados meios ricos nutricionalmente contendo glicose, peptona e extrato de levedura com pH baixo (Golubev, 2006; Mimeo *et al.*, 2009). Para definição das condições de produção e detecção do composto antimicrobiano de *T. japonicum* QU139, foram testados três meios de cultivo: GYP, YM e meio Queijo. Na primeira fase dos testes com os meios citados acima, a 25°C, os meios GYP e YM mostraram-se mais eficientes que o meio Queijo, produzindo maiores halos (Tabela 1). Isso pode ter ocorrido pelo fato dos dois primeiros meios serem possivelmente mais ricos nutricionalmente. O meio Queijo não foi escolhido também pelo motivo da instabilidade na composição de marca /lote de queijo para o outro, o que poderia influenciar na produção dos compostos.

A temperatura usualmente aplicada para a produção de micocinas fica entre 15-20°C. Em países de climas mais quentes, aplica-se temperaturas de 25°C que é a temperatura média do ambiente, não havendo necessidade de salas climatizadas. Altas temperaturas normalmente diminuem a atividade

micocinogênica das leveduras (Golubev, 2006). Isso foi demonstrado pelo experimento de cultivo a 30 °C (Tabela 2). Embora o halo produzido tenha mantido seu diâmetro a 24 horas de incubação, esse foi seu pico, diminuindo a atividade posteriormente quando comparado com a temperatura de 25 °C. Fuentesfria (2007), verificou que a cepa *Trichosporon insectorum* QU89 teve sua atividade antimicrobiana manifestada entre 26-40 °C, em pH 4,0-5,4 no meio YM, mostrando resultados similares a *T. japonicum* QU139, pertencente ao mesmo gênero. Soares & Sato (2000) submeteram a toxina de *S. cerevisiae* Y500-4L a diferentes temperaturas entre 8-30 °C e perceberam que a maior atividade manifestava-se a 22 °C em pH 4,5 e quanto mais próxima da temperatura máxima de incubação associada a pH próximo ao neutro, menor a atividade micocinogênica. Embora a maior parte dos trabalhos avaliem a atividade das toxinas já concentradas e purificadas, corroboram as melhores condições de produção dos compostos antimicrobianos obtidas para as cepas *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102.

Quando comparamos o tamanho dos halos obtidos por *T. japonicum* QU139 em meio GYP, verificamos que o pico de inibição ocorreu em menor tempo para o meio com agitação de 150 rpm de que o meio incubado a 80 rpm, em ambas as temperaturas. Isso contradiz que compostos antimicrobianos produzidos por leveduras são mais estáveis em meios estáticos de que com agitação. Poli (2008) também constatou que a linhagem *killer* que estudou (*S. cerevisiae*) produziu maior quantidade de toxina sob agitação que em meio sem agitação, corroborando os nossos resultados.

Nos pH 4,0, 4,5, e 5,0 o final da fase exponencial coincide com o pico de produção do composto antimicrobiano produzido para ambas as cepas, ocorrendo um aumento da produção da toxina durante a fase *log*, mantendo estabilidade durante a fase estacionária, entretanto *T. japonicum* QU139 teve a produção diminuída com o tempo (Tabela 3) enquanto que para *C. catenulata* LV102 a produção se manteve praticamente estável, assim como observado por Comitini *et al.* (2004b) e da Silva *et al.* (2007). No pH 5,5 o pico de produção dos compostos antimicrobianos não teve relação com o final da fase exponencial, ocorrendo na fase estacionária para *C. catenulata* LV102 e no início da fase *log* para *T. japonicum* QU139, também não tendo relação com os demais pH testados.

A levedura *C. catenulata* LV102 foi avaliada somente no meio GYP, uma vez que em outros trabalhos envolvendo cepas *killer* do gênero *Candida* (Yokomori *et al.*, 1988; da Silva *et al.*, 2007) foram utilizados meios de mesma composição e pH aqui avaliados. Além disso, em experimentos prévios realizados, não houve diferença aparente na produção e detecção dos compostos antimicrobianos de *C. catenulata* LV102 em comparação com *T. japonicum* QU139 (dados não mostrados).

Usualmente são aplicadas entre 10^5 e 10^6 células sensíveis para detecção da atividade micocinogênica, entretanto, como os resultados da análise do sobrenadante eram sempre negativos, diminuiu-se a concentração de células sensíveis para 10^3 células, já que de acordo com Golubev (2006), a concentração de células sensíveis interfere diretamente na detecção da atividade micocinogênica, especialmente quando o composto antimicrobiano é produzido

em baixa concentração. Todos os resultados dos experimentos aqui mostrados foram obtidos depois dessa diminuição na concentração de células sensíveis.

O tamanho dos halos de inibição produzidos tanto por *T. japonicum* QU139 quanto por *C. catenulata* LV102 foram maiores que os obtidos por Fuentefria *et al.* (2007), possivelmente pela diferença no número de células sensíveis (10^6 células), pH (5,5), meio (YM) e o tempo de incubação aplicados no trabalho (3-5 dias). Ambas as cepas foram testadas pelos autores contra uma série de isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*, apresentando inibição de praticamente todas as cepas sensíveis testadas.

As metodologias para purificação dos compostos antimicrobianos testadas neste trabalho são usualmente empregadas no isolamento de glicoproteínas (Santos & Marquina, 2004; Soares & Sato, 2000). Aparentemente, as glicoproteínas são facilmente isoladas e apresentam ampla atividade no sobrenadante, mesmo sem concentrar a amostra (Poli, 2008). Entretanto, na análise de *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102, a atividade contra a célula sensível somente se manifestava quando havia o contato célula-célula, não havendo a mínima detecção de atividade quando somente o sobrenadante filtrado era aplicado nos poços. Por esse motivo, realizou-se a tentativa de co-cultivo, com a célula sensível inativada e adicionada ao cultivo da cepa sensível de *T. japonicum* QU139, e incubados por 24 horas. Assim mesmo não foi detectada atividade no sobrenadante analisado. Esse tipo de estímulo ainda não foi relatado para leveduras, mas algumas bactérias produtoras de bacteriocinas podem

requerer a presença da célula sensível em co-cultivo para iniciar ou aumentar a expressão do composto antimicrobiano (Tabasco *et al.*, 2009). É possível que a toxina, se for de natureza protéica, tenha degradado por condições muito agressivas de precipitação e tenham perdido a atividade, ou mesmo pela agitação do cultivo, uma vez que os resultados obtidos se referem à ação da toxina quando havia contato célula-célula.

Em estudos prévios realizados por Fuentefria (2007), a cepa *T. japonicum* QU139 apresentou material genético extracromossômico (dsRNA), enquanto que em *C. catenulata* LV102 não foi detectada a presença de plasmídeos ou dsRNA (Fuentefria, 2007), assim como relatado para outras cepas *killer* do gênero *Candida* (Yokomori *et al.*, 1988; da Silva *et al.*, 2007), cuja produção de glicoproteína é codificada por genes nucleares.

A ocorrência de micocinas em *Trichosporon pullulans* com peso molecular de 15kDa e associada à presença de dsRNA, já foi relatada por Glolubev *et al.* (2002). Entretanto, mais recentemente relatou-se a produção de glicolípido por *Trichosporon porosum* Pa20 (Kulakowskaya *et al.*, 2009; 2010), extremamente ativo contra fungos ascomicéticos e basidiomicéticos. É possível que o composto antimicrobiano estivesse em tão baixa concentração que sua atividade não tenha sido detectada, mesmo quando realizada a etapa de concentração do sobrenadante, ou tenha uma meia-vida muito curta, ocorrendo degradação durante o processo de isolamento. Ou ainda, que o composto antimicrobiano produzido por *T. japonicum* QU139 seja um glicolípido, conforme

relatado recentemente, não sendo isolado pelas metodologias utilizadas para proteínas/glicoproteínas testadas no presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

As melhores condições de cultivo para produção e detecção dos compostos antimicrobianos, foram obtidas em menor tempo de incubação entre pH 4,5-5,0, à 24 horas em 25°C, tanto para *T. japonicum* QU139 quanto *C. catenulata* LV102.

As cepas *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102 apresentaram o mesmo perfil de produção e detecção dos compostos antimicrobianos produzidos, sendo que a primeira apresenta um espectro de inibição maior.

As substâncias antimicrobianas produzidas por *T. japonicum* QU139 não devem ser proteínas/glicoproteínas, mas sim glicolípídeos, pelos resultados obtidos na tentativa de isolamento de glicoproteínas e pelo relato na literatura da produção de glicolípídeo no gênero *Trichosporon*.

Foi importante testar a ação dos compostos antimicrobianos produzidos pelas cepas *killer* *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102 contra a cepa sensível *C. gattii* C20, já que este fungo normalmente acomete pacientes imunocompetentes, apesar de ter sido isolado de paciente HIV positivo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se considerar que o trabalho apresenta algumas perspectivas:

- Testar metodologias de extração de glicolipídeos;
- Testar a detecção dos compostos antimicrobianos em pH diferente da produção;
- Testar a associação do material extracromossômico com a atividade antimicrobiana para *T. japonicum* QU139.
- Purificação dos compostos antimicrobianos produzidos pelas cepas *T. japonicum* QU139 e *C. catenulata* LV102.
- Produção de anticorpos para desenvolvimento de um novo agente antifúngico.

8. REFERÊNCIAS

ALVES, S.H.; Da MATTA, D.A.; AZEVEDO, A.C.; LORETO, E.S.; BOFF, E.; SANTURIO, J.M.; GUARRO, J. *In vitro* activities of a new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. **Mycoses**, vol.49, p.220-225, 2006.

ÁVIS, T.J. & BÉLANGER, R.R. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. **FEMS Yeast Research**, vol. 2, p.5-8, 2002.

BEVAN, E.A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. *In: Proceedings of the XIth International Congress on Genetic*. p.202-203, 1963.

BRACESCO, N.; SALVO, V.A.; CARRAU, F.M.; NUNES, E. Physicochemical modification of the excretion product of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains results in a fungicidal activity against *Candida albicans* and *Tricophyton mentagrophytes*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 256, p.132-136, 2006.

BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. vol. 100, p. 131-135, 2005.

BITTENCOURT, J.I.M.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Caderno de Saúde Pública**. vol.21, p. 1856-1864, 2005.

BUZZINI, P.; CORAZZI, L.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; MARTINI, A. Characterization of the in vitro antimicotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DVBPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 238, p.359-365, 2004.

CENCI, E.; BISTONI, F.; MENCACCI, A.; PERITO, S.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; VECCHIARELLI, A.A. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. **Current Microbiology**. vol.6, p. 953-961, 2004.

CHANG, M.R.; TAIRA, C.L.; PANIAGO, A.M.M.; TAIRA, D.L.; CUNHA, R.V.; WANKE, B. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. vol.49, n.1, p. 37-39, 2007.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.B.F.; MONFARDINI, L.P.A.; CUNHA, A.K.B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational Study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictions of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. vol.28, n.5, p. 570-576, 2007.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Kluyveromyces paffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. **Microbiology**. vol.150, p. 2535-2531, 2004a.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**. vol.238, p. 235-240, 2004b.

COSTA, A.K.F.; SIDIM, J.J.C.;CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in northeast Brazil. **Mycopathologia**. 2009.

COUTINHO, Z.F.; da SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; de OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidiodomycosis mortality in Brazil, 1980/1995. **Caderno de Saúde Pública**. vol.18, p. 1441-1454, 2002.

CUNHA, M.M.L.; dos SANTOS, L.P.B.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; VERMELHO, A.B.; ROSENAL, S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis . **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. vol.55, p.396-403, 2009.

da MATTA, D.A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.U.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of amulticenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. vol. 57, p.399-404, 2007.

da SILVA, S.; CALADO, S.; LUCAS, C.; AGUIAR, C. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodans* killer toxin, CnKT. **Microbiological Research**. vol. 163, p.243-251, 2008.

FERREIRA, M.S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**. vol.10, p. 161-165, 2009.

FUENTEFRIA, A. M.; FAGANELLO, J.; PAZZINI, F.; SCHRANK, A.; VALENTE, P.; VAINSTEIN, M. H. Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. **Medical Microbiology**. vol.45, p.503-512, 2007.

FUENTEFRIA, A.M. **Bioprospeção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GHANNOUM, A.M. & RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, Mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance . **Clinical Microbiology Reviews**. vol.12, n. 4, p.501-517, 1999.

GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F.G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; URRUTIA, M.; ZARROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**. vol.168, p. 111-116, 2009.

GOLUBEV, W.I. Killer activity in *Cryptococcus humicola*. In: **VIIIth INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YEASTS**. Atlanta, 1992. p.178.

GOLUBEV, W.I. & SHABALIN, Y. Microcins production by the yeast *Cryptococcus humicola* **FEMS Microbiology Letters**. vol. 119, p.105-110, 1994.

GOLUBEV, W.I.; PFEIFFER, I.; GOLUBEVA, E. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **FEMS Microbiology Ecology**. vol. 40, p.151-157, 2002.

GOLUBEV, W.I.; KULAKOVSKAYA, T.V.; KULAKOVSKAYA, E.V.; GOLUBEV, N.W. The fungicidal activity of an extracellular glycolipid from *Sympodiomyopsis paphiopedili*. **Microbiology**. vol.73, n.6, p.724-728, 2004.

GOLUBEV, W.I. Antagonist interactions among yeasts. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (eds), **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer-Verlog, Berlin. p.197-219, 2006.

GOLUBEV, W.I.; KULAKOVSKAYA, T.V.; SHASHKOV, A.S.; KULAKOVSKAYA, E.V.; GOLUBEV, N.V. Antifungal cellobiose lipid secreted by the epiphytic yeast *Pseudozyma graminicola*. **Micribiology**. vol.77, n.2, p.171-175, 2008.

HAWKSWORTH, D.L.; PEGLER, D.N.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8rd ed. London: CAB International, 1995. 616p.

IKEDA, F.; TANAKA, S.; OHKI, H.; MATSUMOTO, S.; MAKI, K. KATASHIMA, M.; BARRETT, D.; AOKI, Y. Role of micafungin in the antifungal armamentarium. **Current Medicinal Chemistry**, vol.14,n.11, p.1263-1275, 2007.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; TÜRELI, A.E. *In vitro* activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, vol.50, p.31-34, 2006.

KABIR, M.E.; KRISHNASWAMY,S.; MIYAMOTO, M.; FURUICHI, Y.; KOMIYAMA, T. An improved phage-display panning method to produce an HM-I killer toxin anti-idiotypic antibody. **BMC Biotechnology**. vol.9 p.99, 2009.

KANAFANI, A.Z. & PERFECT, J.R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. vol.46 p.120-128, 2008.

KHAN, Z.U.; RANDHAWA, H.S.;KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; CHANDY, R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. vol.60 p.312-316, 2007.

KRISHNASWAMY,S.; KABIR, M.E.; MIYAMOTO, M.; FURUICHI, Y.; KOMIYAMA, T.; Different buffer effects in selecting HM-1 killer toxin single chain fragment variable anti-idiotypic antibodies. **Journal of Biochemistry Advance Access**. 2010

KULAKOVSKAYA, T.; KULAKOVSKAYA, E.; GOLUBEV, W.I. ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipidos of *Pseudozyma fusiformata*. **FEMS Yeast Research**. vol.3, p.401-404, 2003.

KULAKOVSKAYA, T.; SHASHKOV, A.; KULAKOVSKAYA, E.; GOLUBEV, W.I.; ZININ, A.; TSVETKOV, Y.; GRACHEV, A.; NIFANTIEV, N. Extracelular cellobiose lipid from yeast and their analogues: structures and fungicidal activities. **Journal of Oleo Science**. vol.58, n.3, p.133-140, 2009.

KULAKOVSKAYA, T.V.; GOLUBEV, W.I.; TOMASHEVSKAYA, M.A.; KULAKOVSKAYA, E.V.; SHASHKOV, A.S.; GRACHEV, A.A.; CHIZHOV, A.S; NIFANTIEV, N.E. Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. **Mycopathologia**. vol.169, p.117-123, 2010.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. P. 1088.

LANDELL, M.F.; HARTFELDER, C.; VALENTE, P. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol.34, n.1, p.49-55, 2006.

LOEFFLER, J. & STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**. vol.36, p.31-41, 2003.

LUNARDI, L.M.; AQUINO, V.R.; ZIMERMAN, R.A.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology and Outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clinical Infectious Diseases**. vol.43, p.60-63, 2006.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS in Molecular Medicine**. vol.8, n.2, p.76-81, 2002.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Review**, vol.10, n.3, p.39-400, 1997.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; SALATI, A.; VACCARI, S.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D.L.; POLONELLI, L. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. **FEMS Yeast Research**, vol.5, p.11-18, 2004.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; TRAVASSOS, L.R.; POLONELLI, L. From yeasts killer toxins to antibodies and beyond. **FEMS Microbiology Letters**, vol.288, p.1-8, 2008.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, vol.5, p.67-71, 2002.

METWALLY, L.; WALKER, M.J.; COYLE, P.V.; HAY, R.J.; HEDDERWICK, S.; McCLOSKEY, B.V.; O'NEILL, H.J.; WEBB, C.H.; McMULLAN, R. Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland 2001-2006. **Journal of Infection**. vol.55, p. 174-178, 2007.

MIMEE, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R. R. Catabolism of floculosin, an antimicrobial metabolite produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Glycobiology**. vol.19, n.9, p.995-1001, 2009.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96

pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.39, n.3, p.255-258, 2006.

MUKHOPADHYAY, K.; KOHLI, A.; PRASAD, R. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol.46, n.12, p.3595-3705, 2002.

NAGAPPAN, V. & DERESINSKI, S. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. **Clinical Infectious Diseases**. vol.45, p.1610-1617, 2007.

PASQUALOTTO, A.M. & DENNING, D.W. Generic substitution of itraconazole resulting in sub-therapeutic levels and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. vol.30, p.93-94, 2007.

PERFECT, J.R.; DISMUKES, W.E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D.L.; GRAYBILL, J.R.; HAMILL, R.J.; HARRISON, T.S.; LARSEN, R.A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.H.; PAPPAS, P.G.; POWDERLY, W.G.; SINGH, N.; SOBEL, J.D.; SORRELL, T.C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**. vol.50, p.291-322, 2010.

PETRIKKOS, G. & SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. vol.30, p. 108-117, 2007.

PINTAR, J. & Starmer, W.T. The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. **Antonie van Leeuwenhoek**. vol.83, p. 89-98, 2003.

POLI, J.S. **Condições para detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; de BERNARDIS, F.; GERLONI, M.; CONTI, S.; MORACE, G.; MAGLIANI, W.; CHEZZI, C. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. **Scandinavian Journal of Immunology**, vol.37, n. 1, p.105-110, 1993.

POLONELLI, L.; de BERNARDIS, F.; CONTI, S.; BOCCANERA, M.; GERLONI, M.; MORACE, G.; MAGLIANI, W.; CHEZZI, C.; CASSONE, A. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. **Journal of Immunology**, vol.152, n. 6, p.3175-3182, 1994.

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; BRACCI, L.; LOZZI, L.; NERI, P.; ADRIANI, D.; de BERNARDIS, F.; CASSONE, A. Therapeutic activity of an

engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, vol.71, n. 11, p.6205-6212, 2003.

PUCHKOW, E.O.; ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; KULAKOWSKAYA, T.V.; SEYDEL, U.; WIESE, A. The mycocidial, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new tipe of cellobiose lipid with detergent features. **Biochemica et Biophysica Acta**. vol.1158, p.161-170, 2002.

ROSELINO, A.M.; SEIXAS, A.B.; THOMAZINI, J.A.; MAFFEI, C.M. Na outbreak of sclap White pietra in a Brazilian children Day care. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. vol. 50, n.5, p.307-309, 2008.

SALLEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSIAN, H.; LEE, Y.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**. vol.27, p.238-254, 2010.

SANTOS, A. & MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, vol.150, p.2527-2534, 2004.

SCHMITT, M.J. & BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Review**, vol.26, p.257-276, 2002.

SCHMITT, M.J. & BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews**, vol.4, p.212-221, 2006.

SCOPES, R.K. **Protein purification – principles and practice**. 3. Ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 282p.

SEGUY, N.; POLONELLI, L.; DEI-CAS, E.; CAILLIEZ, J.C.; Inhibitory effect of a *Pichia anomala* to *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. **Parasitology Research**. vol.82, n.2, p.114-119, 1996.

SEGUY, N.; CAILLIEZ, J.C.; POLONELLI, L.; DEI-CAS, E.; CAMUS, D. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* killer to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. vol.22, p.145-149, 1998.

SELVAKUMAR, D.; MIYAMOTO, M.; FURUICHI, Y.; KOMIYAMA, T. Inhibition of fungal β -1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. **Antimicrobial Agents and Chhemotherapy**. vol.50, n.9, p.3090-3097, 2006.

SEVERO, C.B.; GAZZONI, A.F.; SEVERO, L.C. Chapter 3 – Pulmonary cryptococcosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. vol.35, n.11, p.1136-1144, 2009.

SOARES, G.A.M. and SATO, H.H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y-500-4L killer toxin. **Brazilian Journal Microbiology**, vol.31, p.291-297, 2000.

SPANENBRG, A.; HARTFELDER, C.; FUENTEFRIA, A.M.; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol.32, n.3, p.195-199, 2004.

SRINGER, D.J. & CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**. vol.16, n.1, p.14-20, 2010.

TABASCO, R.; GARCÍA-CAYUELA, T.; PELÁEZ, C. REQUENA, T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. vol.132, p.109-116, 2009.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R.V.; BARBOSA, G.G.; NISHIKAWA, M.M.; MORALES, B.P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.103, n.5, p.455-462, 2008.

YOKOMORI, Y.; AKIYAMA, H.; SCHIMIZU, K. Toxins of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. **Agricultural and Biological Chemistry**. vol.52, p.2797-2801, 1988.

WANG, X.; CHI, Z.; YUE, L.; LI, J.; LI, M.; WU, L. A marine killer yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. **Microbiology Research**. vol.162, p.77-85, 2007.

WIEDERHOLD, N.P. & LEWIS, J.S. The echinocandin micafungin: a review of the pharmacology, spectrum of activity, clinical efficacy and safety. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**. vol.8, p.1155-1166, 2007.

WOODS, D.R. & BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccaromyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. vol.51, p.115-126, 1968.

Anexo 1

Listagem dos meios de cultura utilizados

Caldo GYP	2% glicose (Nuclear); 1% peptona (Himedia); 0,5% extrato de levedura (Himedia)
Ágar GYP	2% Agar (Himedia); 2% glicose (Nuclear); 1% peptona (Himedia); 0,5% extrato de levedura (Himedia)
Caldo YM	1% glicose (Nuclear); 0,5% peptona (Himedia); 0,3% extrato de levedura (Himedia); 0,3% extrato de malte (Himedia)
Ágar YM	2% Agar (Himedia); 1% glicose (Nuclear); 0,5% peptona (Himedia); 0,3% extrato de levedura (Himedia); 0,3% extrato de malte (Himedia)
Meio Queijo	2% Agar (Himedia); 2% glicose (Nuclear); 1% peptona (Himedia); 7,3% extrato de queijo;
Extrato de Queijo	100g queijo minas frescal (Santa Clara); 300mL água destilada.

9. VITA

Dados pessoais

Nome: Luciana Senter

Nascimento: 29/12/1984

Filiação: Roque Senter e Lourdes Matuella Senter

Email: lusenter@yahoo.com.br

Formação acadêmica

2008-2010 – Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

Título: Otimização da produção e purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para desenvolvimento de um novo agente antifúngico.

Orientador (a): Patricia Valente

Bolsista: CAPES

2003-2007 – Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, SC, Brasil.

Título: Avaliação da qualidade microbiológica de salames coloniais e implantação de Boas Práticas de fabricação em uma mini-indústria.

Orientador (a): Eliandra Mirlei Rossi

Co-orientador: Cassius Ugarte Sardiglia

Iniciação Científica

Título: Caracterização Bioquímica de bactérias degradadoras do herbicida atrazina.

Orientador: Cassius Ugarte Sardiglia

2000-2002 – Ensino médio

Escola de Educação Básica Everardo Backheuser, Descanso, SC. Brasil.

1996-1999 – Ensino Fundamental

Escola de Educação Básica Everardo Backheuser, Descanso, SC. Brasil.

1992-1995 – Ensino Fundamental

Escola Reunida Municipal Campinas, Descanso, SC. Brasil.

Produção científica, tecnológica.

Resumos expandidos publicados em anais

- **SETER, L.**; ROSSI, E.M.; SARDIGLIA, C.U. Avaliação da eficiência da implantação de Boas Práticas de Fabricação na qualidade microbiológica de salames artesanais de uma mini-indústria. *In: III Simpósio de Microbiologia Aplicada, Porto Alegre-RS, 2009. Anais do III Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009.*

Resumos em anais de eventos

- **SETER, L.**; LANDELL, M.F.; MAUTONE, J.; SANTOS, K.C.; VAINSTEIN, M.H.; VALENTE, P. Identificação molecular de leveduras isoladas de figueiras do parque de Itapuã - RS. *In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas-PE, 08 a 12 de novembro de 2009. Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2009.*
- KOWALSKI, K.H.P.; **SETER, L.**; VALENTE, P. Padronização de meios de cultivo, pH e temperaturas para produção de toxinas *killer* de leveduras. *In: XXI Salão de Iniciação Científica – UFRGS, Porto Alegre-RS, 19 a 23 de outubro de 2009. Anais do XXI Salão de Iniciação Científica – UFRGS, 2009.*
- ISOPPO, P.; **SETER, L.**; LANDELL, M.F.; VAINSTEIN, M.H.; VALENTE, P. Seleção de leveduras produtoras de lípase para síntese de biodiesel. *In: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre-RS, 11 e 12 de dezembro de 2008. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.*
- **SETER, L.**; STIVAL, M.; LIPRERI, A. ZANELATTO, C.; VALENTE, P. Produção de toxinas *killer* em diferentes meios de

cultivo e pH. *In*: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre-RS, 11 e 12 de dezembro de 2008. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.

Apresentação de trabalhos em eventos

- **SENTER, L.**; SARDIGLIA, C.U. Caracterização bioquímica de bactérias degradadoras do herbicida atrazina. *In*: V Seminário de Iniciação Científica - UNOESC, Videira-SC, 05 e 06 de setembro de 2006. Anais do V Seminário de Iniciação Científica - UNOESC, 2006.

Participação em eventos

- I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.
- I Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2007.
- XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.
- II Feira e IV Seminário de Alimentos, 2005.
- V Semana Acadêmica de Biologia, 2006.
- IV Semana Acadêmica de Biologia, 2005.
- IV Semana Acadêmica de Agronegócios, 2004.
- III Semana Acadêmica de Biologia, 2004.

Participação em Cursos de aperfeiçoamento

- Biologia da Conservação, 2009.
- Inglês Básico II, 2006.
- Higiene para manipuladores de alimentos, 2006.
- Impacto e legislação ambiental, 2005.
- Micropropagação de plantas “*in vitro*”, 2004.

Participação de Comissão Organizadora de Eventos

- I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.

- II Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2008.

Palestras ministradas

- Título: Identificação bioquímica de fungos microscópicos.
Evento: III Simpósio de Microbiologia Aplicada, Porto Alegre-RS, 07 a 10 de outubro de 2009.