

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOSE COM ÊNFASE EM ATIVIDADE LIPASE

Autora: Juliana Mônica da Costa
Orientadora: Profa. Dr^a Maria Lúcia Scroferneker
Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Dissertação de Mestrado

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOSE COM ÊNFASE EM ATIVIDADE LIPASE

Autora: Juliana Mônica da Costa
Orientadora: Profa. Dr^a Maria Lúcia Scroferneker
Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Dissertação de Mestrado

2006

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de tudo, querer.

Autor Desconhecido

Ao meu pai Juarez (*in memoriam*), em especial a minha mãe Zélia por todo o amor e dedicação e ao meu noivo Diogo, pelo carinho, amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores profa. Dr^a. Maria Lúcia Scroferneker e prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini, agradeço por toda a atenção e aprendizado adquirido durante esta caminhada.

Ao Departamento de Química e Física da UNISC, em nome da professora Dr^a. Rosana de Cássia de Souza Schneider, pela utilização dos laboratórios de ensino, fundamentais na execução das análises. Em especial ao prof. Dr. Marco Flores Ferrão, por toda a paciência ao me ajudar nas análises quimiométricas.

Aos bolsistas Thaís de Souza da UFRGS, e Denise e Juliano Vicenti da UNISC pelo auxílio no desenvolvimento de diversas etapas do trabalho.

À direção do Hospital Santa Cruz, em especial a gerente Sr^a Maira Regina Zambiasi pelo incentivo, e liberação para as incansáveis viagens à Porto Alegre.

Aos meus funcionários que souberam compreender os momentos de ausência, que foram muitos, e durante todo o tempo realizaram um ótimo trabalho.

Aos colegas de trabalho pelas palavras de incentivo e carinho nos momentos difíceis.

A uma força suprema que nos mantém fortes, mesmo nos momento mais difíceis em que parece que não vamos conseguir.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1- Cromoblastomicose.....	10
2.1.1- Agentes Etiológicos.....	10
2.1.2- Epidemiologia.....	11
2.1.3- Métodos diagnósticos.....	12
2.1.4- Aspectos clínicos e complicações.....	18
2.1.5- Tratamento.....	20
2.1.6- Fisiopatologia.....	20
2.2 - Lipases.....	23
2.2.1 - Aspectos gerais.....	23
2.2.2 - Ensaios para determinação de Lipase.....	24
2.3 - Espectroscopia no Infravermelho em Microbiologia.....	27
2.3.1 - Aspectos gerais.....	27
2.3.2 - Perspectivas para a espectroscopia de infravermelho em Microbiologia.....	32
2.3.3 - Caracterização de microrganismos por espectroscopia no infravermelho.....	33
2.4 - Quimiometria.....	34
2.4.1 - Aspectos gerais.....	34
2.4.2 - Ferramentas quimiométricas.....	35
3 - OBJETIVOS.....	42
3.1 - Objetivo geral.....	42
3.2 - Objetivos específicos.....	42
5 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

ARTIGO I – ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF CHROMOBLASTOMYCOSIS AGENTS	56
ARTIGO I – CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE.....	74
ARTIGO II – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE DE AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS. PARTE I: CULTIVO EM MEIO SÓLIDO.....	92
ARTIGO III – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE DE AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE, POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS. PARTE II. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....	125

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Padrões de conidiação observadas em agentes etiológicos da Cromoblastomicose. A – *Cladosporium*; B – *Rhinocladiella*; C – *Phialophora*. D – Morfologia microscópica da *Fonsecaea pedrosoi*.....14
- Figura 2: A – Corpos muriformes visualizados em corte histológico (biópsia de pele), corado pela hematoxilinaeosina. B – Corpos muriformes visualizados sob digestão de biópsia de pele com hidróxido de potássio.....18
- Figura 3: Diferentes padrões clínicos de lesões de cromoblastomicose. A – Placa eritematosa. B – Placa descamativa. C – Lesões vegetantes.....19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuições de algumas bandas freqüentemente encontradas em espectro de infravermelho microbiano.....	31
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose ou dermatite verrucosa é uma infecção crônica do homem, usualmente limitada a pele ou a tecidos subcutâneos. O agente etiológico está traumáticamente introduzido dentro do tecido, usualmente por exposição ocupacional direta. Apesar de seu desenvolvimento ser lento e não haver comprometimento de outras partes do organismo, além da área afetada, os indivíduos infectados tendem a se isolar, pelo aspecto e odor desagradáveis que a cromoblastomicose apresenta (Gomes et al., 1992; McGinnis et al. 1983).

Pesquisas realizadas indicam que o médico alemão Max W. Rudolph (1877-1955), diplomado em Hamburgo e radicado no Brasil, tenha sido o primeiro a descrever a cromoblastomicose com o nome de “figueira” em 1914, na cidade de Estrela do Sul, entre os estados de Minas Gerais e Goiás. A ele, segundo Castro & Castro (1978) cabe a descrição desta micose subcutânea. Coube ao pesquisador brasileiro Alexandrino de Moraes Pedroso a primazia de ter observado em São Paulo, o primeiro caso de cromoblastomicose em 1911, na Santa Casa de Misericórdia, não tendo, porém, publicado a referida observação.

Os pesquisadores americanos Lane (1915) e Medlar (1915), registraram nos Estados Unidos da América, o primeiro caso de cromoblastomicose daquele país, com localização na região glútea. Thaxter em 1915 estudou e classificou o fungo isolado da lesão designando-o como *Phialophora verrucosa*.

Sabe-se que, atualmente, a cromoblastomicose não tem recebido a devida atenção, apesar de ser conhecida desde 1930 como uma dermatose parasitária (Lacaz et al., 1991). No entanto, por ser uma micose subcutânea característica de áreas tropicais e por possuir uma grande incidência no norte (Granja et al., 2000; Silva et al., 1999), e alguns casos já diagnosticados no sul (Minotto, et al., 2001) pode-se entender a importância da busca contínua de respostas, que possibilitem um melhor entendimento de aspectos fisiopatológicos

relacionados com o mecanismo de invasão e de desenvolvimento da infecção micótica em questão e que busquem explicar a maior incidência e prevalência micose por *Fonsecaea pedrosoi*. Através de diagnósticos mais sensíveis, bem como tratamentos melhor direcionados, é possível proporcionar melhores condições de convívio na sociedade às pessoas acometidas por esta micose subcutânea, considerando que a mesma, em casos mais avançados, leva à incapacidade dos membros acometidos devido ao seu curso crônico. Esta micose, além de possuir aspecto desagradável, isola os pacientes do convívio social, sendo isto mais um obstáculo na busca de tratamento.

A utilização da quimiometria em conjunto com a espectroscopia no infravermelho é uma técnica recente na classificação e identificação de microrganismos, possibilitando análises mais rápidas, menos trabalhosas e favorecendo a redução de resíduos. Os métodos multivariados são muito adequados, porque permitem a análise de várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou a ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação de dados. Estudos utilizando esta metodologia relatam a existência de correlação entre os espectros de infravermelho da biomassa microbiana e as respostas biológicas fornecidas por ensaios microbiológicos, os quais são analisados através de ferramentas quimiométricas. As ferramentas quimiométricas comumente utilizadas na análise e classificação de microrganismos são, a análise por componentes principais (PCA), análise por agrupamento hierárquico (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar, inicialmente, o perfil enzimático de um conjunto de amostras de agentes de cromoblastomicose utilizando métodos clássicos qualitativos, semiquantitativos e quantitativos, de avaliação de atividades enzimáticas e, posteriormente, explorar o perfil de produção de lipases por estes agentes com auxílio de ferramentas quimiométricas aliadas à Espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cromoblastomicose

A cromoblastomicose, segundo Fonseca e Leão (1930) constitui uma dermatose parasitária, de aspecto polimorfo, com localização nos membros inferiores, apresentando-se sob a forma de nódulos ou verrugas que, posteriormente, podem ulcerar, terminando quase sempre por hiperacantose e hiperkeratose dos tecidos atacados.

A cromoblastomicose é uma infecção crônica granulomatosa que acomete pele e tecidos subcutâneos, onde o fungo se implanta por algum traumatismo. Lesões satélites podem ocorrer também próximas à área da infecção, através da difusão das formas infectivas pelos vasos linfáticos. A frequência desta doença é maior em lavradores, devido ao seu contato frequente com o solo. A lesão tende a se expandir pelo órgão afetado, tornando o tratamento cada vez mais difícil (Lacaz, 1991).

2.1.1 Agentes Etiológicos

Os agentes da cromoblastomicose são classificados, taxonomicamente, da seguinte forma: Reino Fungi; Phylum: Ascomycota; Ordem: Chaetothyriales; Família: Herpotrichiellaceae (Caligiorno, 1999).

De acordo com a classificação mais antiga, todos os fungos negros eram agrupados na família Dematiácea (Silveira, 1981). Atualmente uma nova classificação passou a ser adotada, levando-se em consideração as relações genéticas associadas aos perfis morfológicos e fisiológicos das espécies de fungos (Alexopoulos et al., 1996). Entretanto o termo dematiáceo é ainda utilizado pelos micologistas.

Atualmente, as espécies mais conhecidas da doença são *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa* (Masclaux et al., 1995; Ripon, 1988; Lacaz, 1991). As espécies *Exophiala jeanselmei* e *Cladosporium bantianum* aparecem como agentes etiológicos raros da cromoblastomicose, sendo classificados por muitos autores como fungos dematiáceos, agentes etiológicos de feo-hifomicoses. No entanto Nsanzumuhire, et al., 1974, relata um caso de cromoblastomicose, em que o agente etiológico foi classificado como *Cladosporium trichoides*. Neste mesmo ano, Ajello duvidou da identificação do isolado realizada por Nsanzumuhire et. al. Então uma nova análise foi realizada, confirmando que o isolado era de *Cladosporium bantianum* (*Cladophialophora bantianum*). Lacaz, 1991, relata um caso de cromoblastomicose causada por *Exophiala jeanselmei*, isolada em 1981, que foi tratada com cetoconazol, obtendo excelentes resultados. Por estas razões, isolados de *Cladosporium bantianum* e *Exophiala jeanselmei* são considerados como agentes etiológicos da cromoblastomicose.

Os fungos envolvidos nesta patologia apresentam pigmento (melanina) em sua parede celular conferindo-lhe uma coloração que varia desde o marrom claro até o negro. Além disto, são considerados ubiqüitários na natureza, integrando-se a microbiota do solo, água, matéria orgânica em decomposição e de produtos de origem vegetal. (McGinnis et al. 1983)

2.1.2 Epidemiologia

O agente *Fonsecaea pedrosoi* tem sido isolado predominantemente em nosso meio (Oliveira, 1972), assim como de outros países de clima úmido (Rippon, 1988). A doença predomina nas regiões tropicais e subtropicais do continente latino-americano, embora possa ocorrer no mundo inteiro. Na América Central ocorre principalmente em Costa Rica e Porto Rico (Resende, 1975). Na América do Sul estudos epidemiológicos iniciais relatam que os focos de

maior incidência estão localizados na Venezuela, Colômbia e Brasil (Bopp, 1959). Brygoo & Destombes, 1976, descreveram os países com o maior número de casos registrados, como sendo, Brasil, Madagascar, Costa Rica, República Dominicana, Austrália, Cuba, China, Japão, Venezuela e Estados Unidos.

Estudos epidemiológicos revelam uma maior ocorrência de casos de cromoblastomicose em homens. No Madagascar um estudo realizado por Esterre et al., 1996, relata uma retrospectiva de casos ocorridos desde 1978 até 1995, onde foi observado que os homens são afetados em 87% dos casos. Fundora et al., 1989, encontraram resultados compatíveis, com 82,9% de indivíduos do sexo masculino em Cuba. Em 1994 Li et al., descreveram 325 casos de cromoblastomicose ocorridos na China durante 10 anos e observaram uma proporção de 4 homens para cada mulher. Na Índia Sharma et al., 1999, descreveram 34 casos de cromoblastomicose, observando uma proporção de 5,8 homens para cada mulher.

No Brasil, a micose ocorre em várias regiões, sendo a região amazônica considerada a principal área endêmica da doença, atingindo principalmente os trabalhadores rurais do sexo masculino (Granja, et al., 2000; Silva, et al., 1999; Olivera, 1972). Minotto et al., (2001), realizaram um estudo de prevalência de cromoblastomicoses no estado do Rio Grande do Sul por um período de 29 anos e encontraram entre os 100 casos estudados o predomínio do sexo masculino (4:1) e de agricultores brancos com idade variando entre 50-59 anos, com lesões de membros inferiores, a maioria proveniente da região norte do estado.

2.1.3 Métodos diagnósticos

A identificação das espécies é realizada através das características macromorfológicas das colônias associadas às características micromorfológicas observadas pelo método de cultivo em lâmina. Os achados macromorfológicos das colônias de cada espécie não

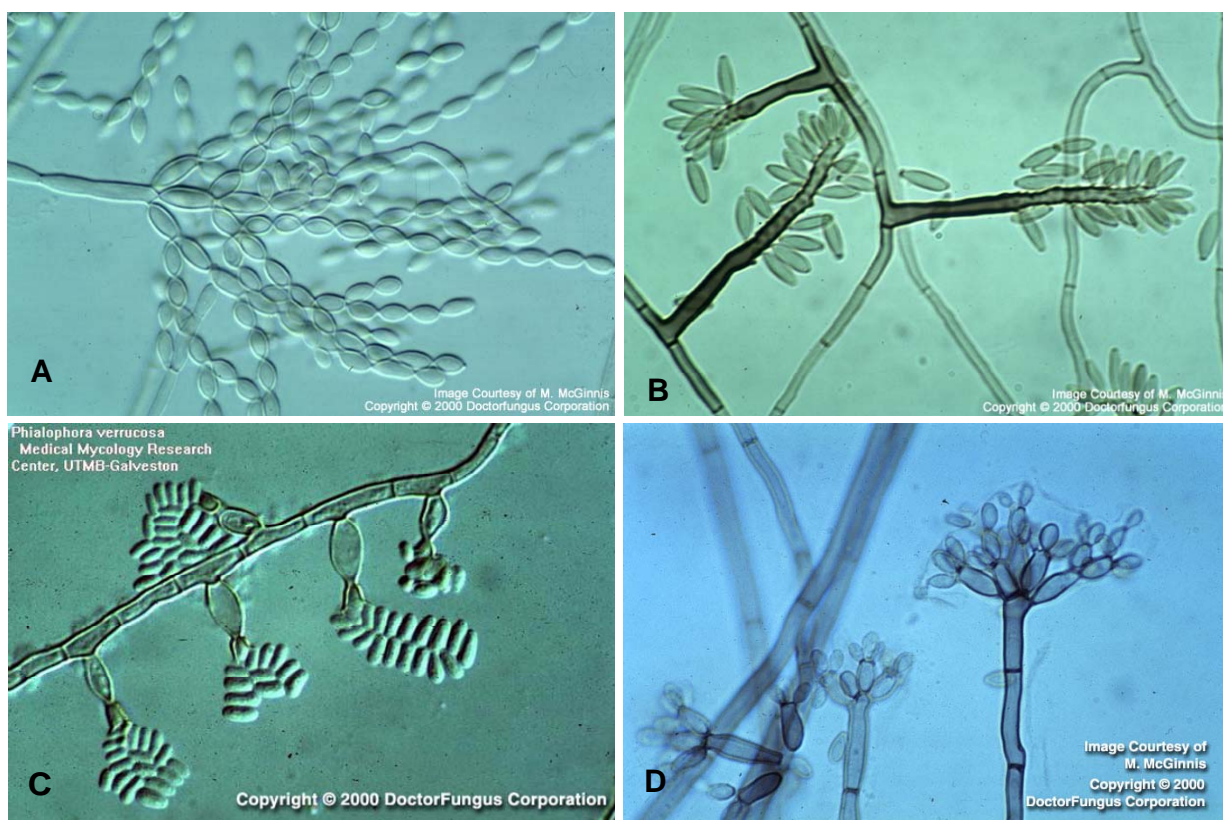
apresentam características diferenciais relevantes (Kern, 2000 e Sidrim, 1999).

Os agentes da cromoblastomicose produzem colônias de maturação lenta (quatorze dias), de tom marrom-escuro, verde oliva ou negro. A superfície é espalhada e chata, podendo mostrar-se levemente elevada no centro ou pregueada. Um micélio aéreo e curto confere-lhe uma textura aveludada ou lanosa. Não se observa a liberação de pigmentos difusíveis no meio de cultura, exceto sob condições de inibição da síntese de melanina por triciclazol. Seu cultivo, é realizado em ágar Sabouraud- BHI (SABHI) à temperatura ambiente (Kern, 2000 e Sidrim, 1999; Ficher e Cook, 2001).

O estudo micromorfológico dos padrões de conídios, bem como a percentagem desses na micromorfologia, são de fundamental importância na determinação do gênero e da espécie do fungo envolvido. Na Figura 1, são apresentados os três principais tipos de conidiação, *Phialophora*, *Rhinocladiella* e *Cladosporium*, que podem ser caracterizados da seguinte maneira (Sidrim, 1999):

- *Cladosporium*: estruturas fúngicas (conidióforos) que formam cadeias de conídios e que se ramificam através do brotamento apical;
- *Phialophora*: estruturas em forma de jarros (fiálides vasiformes) disposta ao longo das hifas que originam os conídios. Estes, por sua vez, se aglomeram na parte superior das fiálides;
- *Rhinocladiella*: conídios unicelulares que emergem opostos uns aos outros na ponta do conidióforo, que é uma estrutura alongada gerada ao longo das hifas.

O agente etiológico de maior prevalência nos casos de cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, apresenta hifas dematiáceas septadas, e pelo menos dois dos três tipos de conidiação anamórfica (*cladosporium*, *phialophora*, *rhinocladiella*), devem ser observados, figura 1.



Fonte: www.Doctorfungus

Figura 1: Padrões de conidia observadas em agentes etiológicos da Cromoblastomicose. A – *Cladosporium*; B – *Rhinocladiella*; C – *Phialophora*. D – Morfologia microscópica da *Fonsecaea pedrosoi*.

Usualmente a doença é diagnosticada pela combinação do exame direto microscópico de fragmento de lesão e de pus, exame histopatológico, a partir de biópsia e cultura de um desses espécimes clínicos. A identificação laboratorial dos agentes etiológicos muitas vezes é difícil pelo fato de suas características de cultivo sobreporem-se e de serem semelhantes a fungos dematiáceos que causam micetomas e abscessos cerebrais. Por este motivo o valor de técnicas sorológicas foi reconhecido em 1936 para identificação e classificação desses fungos (Cooper & Schneidau, 1970).

O estudo da imunologia da cromoblastomicose teve início no ano de 1927, quando Montepelier & Catarrei tentaram aglutinar esporos de *Phialophora pedrosoi* (*Fonsecaea pedrosoi*) com soros de pacientes acometidos pela doença. Meriin, (1932), conseguiu obter reação de fixação de complemento positiva, porém não específica. Balina et al., no mesmo ano, demonstraram que anticorpos diminuem com o tratamento da doença.

Anticorpos precipitantes foram demonstrados em soros de pacientes com cromoblastomicose através da imunodifusão dupla (Bucley & Muray, 1966). Em 1969, Oliveira testou o antígeno metílico de *Fonsecaea pedrosoi* em pacientes com cromoblastomicose, paracoccidioidomicose, lepra, sífilis e indivíduos normais. Somente pacientes com cromoblastomicose apresentaram reação positiva para fixação do complemento. Copper & Schneidau (1970) revelaram que *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *Cladosporium carrionii* possuem antígenos comuns e, através da imunodifusão e imunoeletroforese, demonstraram que, *P. verrucosa* e *C. carrionii* são antigenicamente semelhantes. Lacaz et al. (1982) realizaram testes de intradermorreação com antígeno EP-1 obtido por Iwatsu (1979), em pacientes de cromoblastomicose, resultando em 66,6 % de positividade. Um destes pacientes era portador de lesão cicatricial, ficando claro que a hipersensibilidade tardia persiste mesmo após cura clínica e micológica.

Mais recentemente, vem sendo sugerido o uso de exoantígenos na identificação de fungos dematiáceos através da microimunodifusão. Segundo Kaufman & Standard (1987), este teste é de grande utilidade na identificação de vários fungos patogênicos. Muitos fungos produzem ou carregam um único antígeno, o exoantígeno, e o seu reconhecimento resulta na caracterização do fungo até nível de espécie. Exoantígenos são definidos como antígenos ou macromoléculas imunogênicas solúveis, produzidas por fungos no início do seu crescimento. Esses antígenos podem ser detectados em meios líquidos ou extratos aquosos de cultura de fungos em meios sólidos, e seu uso apresenta vantagens como a diminuição de custos

laboratoriais e da exposição a fungos patogênicos. Exoantígenos podem também ser utilizados em sorologia, auxiliando o diagnóstico, prognóstico e controle de tratamento da doença (Espinel-Ingroff et al., 1986), além de produzirem resultados mais rápidos que culturas ou exames histopatológicos (Camargo et al., 1988).

Exoantígenos de culturas de 100 amostras de fungos dematiáceos foram obtidos por Espinel-Ingroff et al. 1988, juntamente com anti-soros de *C. bantianum*, *F. pedrosoi* e *P. verrucosa*. Através da prova de imunodifusão observando linhas de identidade e não identidade, os autores realizaram diferenciação presuntiva de *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *C. bantianum*.

Villaba & Yegres (1988) detectaram anticorpos em soros de pacientes acometidos pela infecção causada por *C. carrionii*, usando imunodifusão dupla e antígenos somáticos e filtrado de cultura. A falta de interesse no investimento em testes sorológicos para cromoblastomicose deve-se ao fato do exame microscópico direto do material clínico ser um método suficiente para o diagnóstico da infecção, não permitindo, no entanto a avaliação do prognóstico e monitoramento da terapia, através da detecção dos títulos de anticorpos (Rippon, 1988; Villaba, 1988). A avaliação sorológica de pacientes com cromoblastomicose ainda não está incluída na prática cotidiana auxiliar no diagnóstico. De qualquer forma, ao se realizar a sorologia, é necessário ter o cuidado na utilização de antígenos adequados, pois antígenos micelianos apresentam muitas reações cruzadas entre fungos dematiáceos enquanto que, sobrenadantes de culturas são mais específicos (Kaufman et al., 1987). Barros & Resende (1999), estudaram a composição química de antígenos salino, metabólico e metílico de quatro dos agentes etiológicos da cromoblastomicose, sendo estes *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *R. aquaspersa* e *C. carrionii*. Os antígenos metílicos apresentaram os maiores teores de lipídeos enquanto os metabólicos os maiores teores de carboidrato.

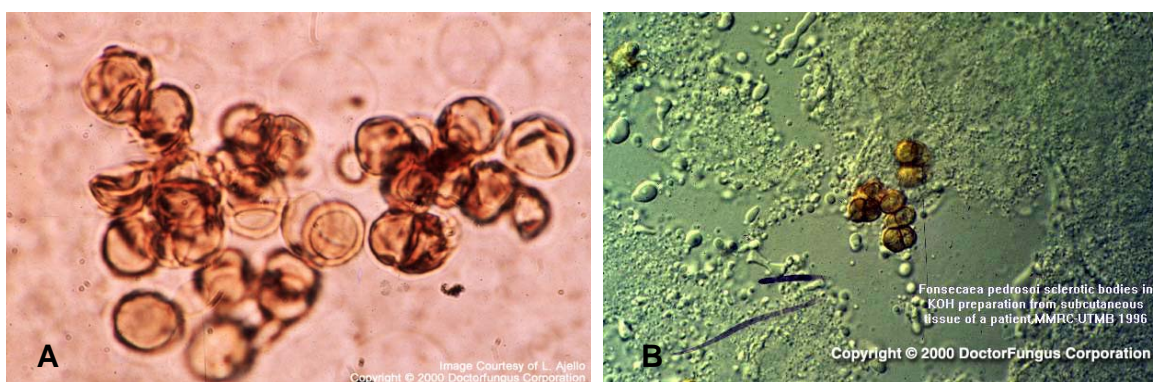
Vidal et al. (2002) estudaram um antígeno de *Fonsecaea pedrosoi* para o soro diagnóstico da cromoblastomicose através das técnicas de Reação de Imunodifusão dupla, Contraímunoeletroforese, Imunoeletroforese, ELISA e “Immunoblotting” com soros de cromoblastomicose, esporotricose, leishmaniose cutânea, e soro hiperimune produzido em coelhos e soros normais. O antígeno revelou especificidade de 96,9% e 100% de sensibilidade para os soros de cromoblastomicoses.

Pouco se sabe sobre o comportamento de metabolismo primário de *Fonsecaea pedrosoi*. Algumas informações obtidas na literatura indicam a dificuldade de adaptação do fungo a substratos ácidos, e o seu estímulo ao crescimento em presença de vitamina do complexo B (Martini et al., 1986).

Sendo um fungo dematiáceo produtor de melanina, ou seja, com um metabolismo secundário bem caracterizado, já se tem observado que a assimilação de substratos como a glicose na presença de inibidores da síntese de melanina, como o triciclazol, leva a alterações do metabolismo primário (Costa et al., 2004). Um outro aspecto importante a considerar é que as proteínas utilizadas como antígeno para estudos imunológicos, são liberadas no meio de cultura como um reflexo de estímulo de um fator nutricional presente neste meio obrigando o fungo a assimilá-lo. Sobre este aspecto estas proteínas seriam caracterizadas como proteínas funcionais, sintetizadas a partir da adaptação do fungo ao meio de cultivo, refletindo aspectos do seu metabolismo primário, e assim contribuindo para os fatores de patogenicidade e virulência.

2.1.4 Aspectos clínicos e complicações

Os parasitos agentes da cromoblastomicose apresentam-se nos tecidos lesados sob a forma de elementos esféricos ou ovóides, constituindo os chamados “corpúsculos muriformes” (células muriformes) semelhantes à castanha, com divisão transversa ou longitudinal, de acordo com a figura 2.



Fonte: www.Doctorfungus

Figura 2: **A** – Corpos muriformes visualizados em corte histológico (biópsia de pele), corado pela hematoxilinaeosina. **B** – Corpos muriformes visualizados sob digestão de biópsia de pele com hidróxido de potássio.

A cromoblastomicose inicia-se pela erupção de pápulas, verrugas ou nódulos que posteriormente podem ulcerar. A localização destes nódulos ou verrugas é variável, mas na maioria dos casos eles se dispõem nos membros inferiores, na pele e nos tecidos subcutâneos, propagando-se às vezes à rede linfática. A supuração dos nódulos pode efetuar-se quando, ao lado do fungo, encontramos germes de infecção secundária. As lesões são bastante hemorrágicas. Os nódulos e pápulas aumentam em número e volume e os mais antigos, devido ao adelgaçamento crescente da epiderme que os recobre, ulceram-se; sobre a superfície dessas pequenas úlceras pode dispor-se uma crosta aderente e espessa. Outras vezes, porém

o fundo dessas úlceras torna-se vegetante, adquirindo aspecto papilomatoso, semelhante a uma couve-flor. As verrugas podem ser planas, crostosas ou, então, pediculadas; outras vezes confluem, formando extensas placas que podem ulcerar. A micose é de evolução lenta, não tendo repercussão sobre outras partes do organismo. (Lacaz et al., 1991)



Fonte: www.Doctorungus

Figura 3: Diferentes padrões clínicos de lesões de cromoblastomicose. **A** – Placa eritematosa. **B** – Placa descamativa. **C** – Lesões vegetantes.

2.1.5 Tratamento

Embora não seja uma doença debilitante, seu tratamento é difícil, principalmente nos casos mais antigos, com lesões mais extensas. As tentativas de tratamento são numerosas, como o uso de excisão cirúrgica ou eletrocoagulação das lesões, uso de agentes químicos e físicos como raios-X, calor, Calciferol e Pentamidina. Os primeiros relatos de cura foram descritos por Lopes, et al., (1969) e Lopes et al., (1971) com emprego de 5-fluorcitosina e por Bayles (1971) com o uso de tiabendazol. Atualmente a terapia adotada consta de associação de anfotericina B com 5-fluorcitosina ou em associação com itraconazol.

2.1.6 Fisiopatologia

Por ser uma micose subcutânea com invasão dos tecidos, o padrão da lesão e quadro clínico desenvolvido parecem estar relacionados com a atividade enzimática secretada pelo agente que se relacionam com a virulência e a patogenicidade à semelhança do que já se tem observado com outras dermatomicoses.

O primeiro estudo de produção de elastase por fungos patogênicos foi realizado por Rippon & Varadi (1968). Foi comprovado que alguns dermatófitos e uns poucos fungos subcutâneos e de invasão profunda produzem esta enzima. Em geral a enzima foi produzida por organismos associados com o tipo de infecção mais inflamatória. Dentre os fungos testados encontram-se alguns agentes da cromoblastomicose: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum* e *Phialophora verrucosa*. Para ambos os fungos os testes demonstraram resultado negativo.

Kwon-Chung et al., (1985), realizaram estudos referentes à produção de proteinase extracelular por *Candida albicans*, como sendo um fator de virulência. Sendo que comprovaram

que o grau de virulência está correlacionado com a quantidade de proteinase produzida, estes resultados concordam com MacDonald & Odds, (1983).

Estudos relatados por Shimizu et al., (1995) comprovam a produção de hialuronidase e condroitina sulfatase por *Candida albicans*, porém sua correlação com fator de patogenicidade não foi observada.

Vários microrganismos produzem enzimas hidrolíticas e estruturas as quais auxiliam na sua patogenicidade. Acredita-se que as enzimas liberadas nos tecidos infectados, particularmente proteinase e fosfolipase são importantes fatores de virulência para *Candida albicans* (Coutinho et al., 2000).

Estudos realizados com cepas de *Malassezia pachydermatis* isoladas de dermatites e otites em cães, produziram proteinase, fosfolipase, condroitina-sulfatase e hialuronidase, sugerindo que estas enzimas possuem potencial patogênico (Coutinho et al., 2000).

A produção de enzima extracelular em *Microsporum canis* e seu papel no fator de virulência foram estudados por Viani et al., (2001). Este estudo realizou dosagem qualitativa de queratinase, elastase, lipase e DNase. Infecções experimentais em cobaias demonstraram clinicamente e microbiologicamente que alta atividade de queratinase, *in vitro*, induzia a produção de infecção aguda, mais rápido do que a infecção induzida por uma cepa com baixa atividade de queratinase (Viani et al., 2001).

Como um componente bioquímico importante de todos os microrganismos, a proteinase representa um distinto grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de peptídeos vinculados a proteínas. Somando-se a sua função em nutrição e catabolismo de proteína, ela poderia ser fator de patogenicidade e poderia influenciar na distribuição ecológica. Recentemente um estudo de protease intracelular em *Paracoccidioides brasiliensis*, tem revelado serina-, cistina- e metalo-proteases nas formas micelial e leveduriforme do microrganismo, sendo que esta atividade foi maior na forma micelial. A atividade mínima ou a não atividade em gelatinase foi

observada por método em zimografia. Método no qual, filtrados de culturas depois de purificados são corridos em gel de poliacrilamida. A zimografia é um teste mais sensível do que os tradicionais, e em um mesmo meio pode-se identificar e quantificar várias atividades enzimáticas (Zambrano et al., 2001).

A caracterização enzimática em fungos dematiáceos, especialmente agentes da cromoblastomicose não tem sido alvo de muitos estudos. Porém em 2003, Keipp e colaboradores, realizaram a avaliação da produção de fosfatase na parede celular de duas amostras de *Fonsecaea pedrosoi*, demonstrando que, tanto para as formas de conídio, micélio e esclerótica, houve atividade, porém para a forma esclerótica ela foi mais intensa.

Pouco se sabe sobre o comportamento de metabolismo primário de *Fonsecaea pedrosoi*. Algumas informações obtidas na literatura indicam a dificuldade de adaptação do fungo a substratos ácidos, e o seu estímulo ao crescimento em presença de vitamina do complexo B (Martini et al., 1986).

Sendo um fungo dematiáceo produtor de melanina, ou seja, com um metabolismo secundário bem caracterizado, já se tem observado que a assimilação de substratos como a glicose na presença de inibidores da síntese de melanina, como o triciclazol, leva a alterações do metabolismo primário (Costa et al., 2004).

Estes resultados têm levantado questões quanto à possibilidade do fungo alterar seu perfil de excretar enzimas sob condições de stress metabólico, sendo que estas enzimas poderiam ser alvo de investigações quanto a sua relação com patogenicidade, virulência e imunogenicidade. Logo no estado de arte em que se encontram as investigações nesta área, abrem-se novas possibilidades de pesquisa correlacionando aspectos do metabolismo primário com a patogenicidade e a virulência deste patógeno.

2.2 Lipases

2.2.1 Aspectos gerais

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the international Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até quatro dígitos referentes à classe e subclasse a que a enzima pertence.

Entre as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, detergentes, entre outras), encontram-se as lipases (Pandey et al. 1999). Lipase é o nome genérico de um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1). São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e amilólise, e por atuar em substratos não naturais (Jaeger e Eggert, 2002).

As esterases (E.C. 3.1.1.1) que muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, são carboxi éster hidrolases amplamente distribuídas na natureza, pois atuam essencialmente catalisando a hidrólise de ésteres. Porém sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água (Alvarez-Macarie et al., 1999).

As lipases são um importante grupo de biocatalisadores que possuem uma função importante no crescimento tecnológico, baseado em sua habilidade de conduzir reações tanto no meio aquoso, quanto não aquoso. Lipases (triacilglicerol acilhidrolase; EC 3.1.1.3) catalizam e hidrolisam, para liberar ácidos graxos e glicerol (Gupta et al., 2003).

2.2.2. Ensaio para determinação de lipase

As lipases podem ser vistas tanto em enzimas lipolíticas quanto estereolíticas, presentes na catálise de um grande número de ésteres. A atividade da lipase pode ser mensurada, pela liberação de qualquer ácido graxo ou glicerol de triacilgliceróis ou ésteres de ácidos graxos (Gupta et al., 2003).

Em síntese os métodos qualitativos e quantitativos mais utilizados para determinação de lipase em pesquisa estão descritos a seguir.

Testes qualitativos e quantitativos para analisar ácidos graxos

Os ácidos graxos liberados pela hidrólise de lipases podem ser determinados qualitativamente por ensaio de difusão em ágar, e quantitativamente por titrimetria, ensaios colorimétricos, fluorescência, procedimentos cromatográficos e através de métodos imunológicos (Gupta et al., 2003).

Ensaio qualitativo

Ensaio de produção de lipase em placa são convencionalmente realizados em tributirina (tributirina-glicerol). A hidrólise da zona de tributirina é indicativo de atividade de lipase ou esterase. Mais recentemente, ágar enriquecido com óleo de oliva também tem sido utilizado para discriminar colônias lipase positivas (Kim, et al., 2001).

O método de difusão em ágar pela tributirina é o método de escolha da maioria dos pesquisadores (Windgassen, et al., 2000; Tan et al., 1992). Além da tributirina, outros

substratos são também empregados, como o Tween 80 sozinho ou em combinação com azul de nilo ou óleo com sais de cobre (Kouker, et al., 1987).

Ensaio de difusão em gel têm sido utilizados amplamente para selecionar produtores de lipase em várias culturas microbianas sobrenadantes, como na hidrólise de triacilgliceróis, onde uma zona clara é produzida (Lawrence, et al., 1967).

Ensaio quantitativo

Estes ensaios compreendem métodos baseados na titrimetria, espectrofotometria no visível, cromatografia, fluorimetria e imunologia.

A titrimetria é um dos mais antigos e amplamente utilizados métodos quantitativos para dosagem de lipase, devido a sua simplicidade, exatidão e reprodutibilidade. A trioleína, ou uma alternativa mais barata, o azeite de oliva, o qual contém 70% de trioleína, são geralmente utilizados. Entretanto, tributirina, triacetina (triacetilglicerol) e tripropionina (tripropionilglicerol) podem também ser utilizados como substratos para estimar a atividade enzimática (Staubmann, et al., 1999). Uma desvantagem da titrimetria é a demora e a laboriosidade do método.

Métodos colorimétricos e fluorimétricos parecem ser uma opção para agilizar e simplificar as análises, entretanto os substratos são caros e por isso estas técnicas não são utilizadas amplamente como ensaios de rotina (Gupta et al., 2003).

Os ensaios espectrofotométrico com palmitato de p-Nitrofenila, são realizados, utilizando-se ésteres de ácidos graxos com vários comprimentos de cadeia como substrato, a liberação do p-Nitrofenol é medida espectrofotometricamente em 410 nm. A maior limitação deste método, é de que a reação enzimática não pode ser realizada em pH ácido, devido à falta de absorvância do palmitato de p-Nitrofenila neste meio (Kademi, et al.; 2000).

Ensaio de espectroscopia são também baseados na precipitação de ácidos graxos liberados pela hidrólise do Tween 20 com cloreto de cálcio, onde o aumento da absorbância é medido em 500 nm. Este método turbidimétrico é muito simples e até 36 vezes mais sensível do que o ensaio titrimétrico com Tween 20, e até quatro vezes mais sensível do que o método espectrofotométrico com palmitato de p-nitrofenol (Gupta et al., 2003).

O ensaio com palmitato de p-nitrofenila é o método de escolha para determinar a atividade esterolítica de lipases. Entretanto, há uma necessidade de distinguir a atividade esterolítica das lipase de esterases. Por esta razão, devem ser utilizados vários ensaios padrões, simultaneamente, para que uma enzima possa ser considerada conclusivamente como uma lipase verdadeira (Gupta et al., 2003).

A cromatografia é um método conclusivo para a determinação direta de ácidos graxos liberados (Gupta et al., 2003).

Cromatografia em camada delgada: Análises quantitativas de ácidos graxos livres de triacilgliceróis, que podem ser quantificados, utilizando-se métodos densitométricos ou autoradiográficos. Estes métodos são muito sensíveis e podem detectar ácidos graxos em poucos picomols (Gupta et al., 2003). A principal desvantagem é de que eles são descontínuos e muito demorados.

Cromatografia Líquida: No método oficial da Sociedade Americana de Óleos Químicos, os ácidos graxos são convertidos em seus metil esterres e submetidos para quantificação em cromatografia gasosa.

Cromatografia Líquida de alta performance: O produto da lipólise tem sido também facilmente identificado, através de HPLC, e tem sido utilizado para quantificação de lipases em *Pseudomonas sp.*, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum* (Brune, et al., 1992) e *Penicillium sp.* (Gulomova, et al., 1996).

Entre os métodos imunológicos, os métodos ELISA são altamente específicos e sensíveis. Vários métodos ELISA têm sido desenvolvidos para quantificar lipase pura, em pancreatite humana, lipase gástrica, lipoproteína e lipase hepática (Vilella e Joven, 1998), além de serem utilizados para determinação de lipase em alguns microrganismos.

Uma grande variedade de métodos tem sido utilizada nas duas últimas décadas para identificação de leveduras em laboratório de microbiologia clínica. Estes testes incluem, métodos rápidos como testes enzimáticos realizados nas colônias após a isolamento primária, ou diretamente em diferentes isolados em placas, e testes imunológicos com anticorpos monoclonal e policlonal, ou ainda métodos bioquímicos e enzimáticos com assimilação de carboidratos, incluindo métodos manuais ou automatizados. Algumas técnicas promissoras estão surgindo, como a análise celular de ácidos graxos por métodos espectroscópicos e por cromatografia líquida (Freydiere, et al., 2001).

2.3 Espectroscopia no Infravermelho em Microbiologia

2.3.1 Aspectos gerais

A espectroscopia no infravermelho (EIV) tem sido utilizada em vários estudos da área médica e biológica. Algumas das vantagens do infravermelho, como ferramenta para caracterizar e diferenciar espécimes clínicos, baseiam-se na simplicidade do método e no baixo custo da análise em relação a outras metodologias, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e técnicas moleculares, além da natureza limpa do processo sem gerar resíduo e sem destruir a amostra. O ensaio por reflectância difusa (DRIFTS do inglês *diffuse reflectance of infrared by Fourier Transform Spectroscopy*) utilizado em amostras sólidas, exige apenas poucos miligramas do material em estudo. Já a técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR, do

inglês *attenuated total reflectance*) utiliza amostras na faixa de até microgramas, mais especificamente quando se tratam de amostras de proteínas em solução aquosa (Naumann,2000).

Espectros no infravermelho da célula microbiana intacta são altamente específicos, como a assinatura ou impressão digital metabólica (*metabolic fingerprint*), os quais são utilizados para diferenciar, classificar e identificar diversas espécies e linhagens microbianas. São também utilizados para (1) detectar *in situ* compostos intracelulares ou estruturas, como a inclusão de corpos, armazenagem de material e endosporos, (2) monitorar e quantificar metabolicamente a liberação de CO₂ em resposta a diferentes substratos, e (3) caracterizar o fenômeno de crescimento dependente e interações célula – droga (Naumann, 2000).

As informações utilizadas para a caracterização microbiana, estão geralmente distribuídas sobre o conjunto da região do infravermelho do espectro eletromagnético, isto é sobre o infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), infravermelho médio (MIR, do inglês *mid infrared*) e infravermelho distante (FIR, do inglês *far infrared*). As bandas do espectro podem ser sistematicamente extraídos de partes largas e complexas do contorno espectral utilizando técnicas de resolução aumentada, diferença espectroscópica, e modelos de reconhecimento, como métodos de análise de fatores, análise por grupamento, e redes neurais artificiais (Naumann, 2000).

Em 1911 W.W. Conbletz foi provavelmente o primeiro cientista a sugerir que materiais biológicos podem ser úteis quando analisados por meio de espectroscopia de infravermelho. A utilização da espectroscopia de infravermelho como um meio de diferenciação e identificação de bactérias foi extensivamente relatado nos anos 50 e 60 (Norris, 1959; Riddle, et al., 1956). Em 1959 uma revisão crítica sobre este assunto sumarizou que, embora as bactérias exibissem espectro no infravermelho únicos para cada linhagem, a identificação das mesmas por esta técnica não poderia ser considerada um método prático, porque além de consumir tempo os

procedimentos eram onerosos e caros para a época (Norris, 1959). Por causa das especificações limitadas dos espectros de infravermelho naquela época (sensibilidade, tempo e reprodutibilidade), relatos de aplicações da espectroscopia de infravermelho para identificação de microrganismos tornaram-se pouco freqüentes nos anos 60 e estagnaram na metade dos anos 70 (Naumann, 2000).

Os anos 80 e 90, evidenciaram a emergência de sensibilidade, rapidez e aumento na precisão das técnicas físicas para análise microbiológica. Estas novas técnicas incluíam a espectroscopia de massa (EM), espectroscopia molecular (incluindo fluorescência, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman), e a aplicação de tecnologias a laser, e a citometria de fluxo, para diferentes técnicas de separação, como cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (Nelson, 1991).

O desenvolvimento da espectroscopia interferométrica de infravermelho moderna e a disponibilidade de microcomputadores robustos e de baixo custo, bem como de novos algoritmos de análise estatística multivariada e o reconhecimento de metodologias modelo, tais como a análise de fatores e as redes neurais artificiais contribuíram para o renascimento da espectroscopia no infravermelho como um meio de caracterização de amostras microbianas. O desenvolvimento destas técnicas foi paralelo aos avanços das técnicas genéticas moleculares em microbiologia, os quais associados poderão, presumivelmente, dar origem aos instrumentos mais sensíveis e específicos para a caracterização microbiana no futuro (Naumann, 2000).

Em 1991, Naumann et al. publicaram um artigo apontando as capacidades da espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) para diferenciar, classificar e identificar microrganismos. Este trabalho, em conjunto com outras publicações do mesmo autor e colaboradores, Helm et al., 1991, são referências para trabalhos futuros.

A espectroscopia de infravermelho apresenta, atualmente, diversas vantagens em relação a outras técnicas de classificação e identificação de microrganismos (Naumann, 2000):

a) O método é uniformemente aplicável a virtualmente todos os microrganismos que podem crescer em meios de cultura. Os requerimentos de biomassa são pequenos, uma quantidade correspondente a aproximadamente cem (100) células podem ser analisadas. Os resultados são avaliados dentro de minutos após a obtenção de amostras adequadas do cultivo puro.

b) A detecção, enumeração, classificação e identificação podem ser integradas em somente um instrumento quando é utilizado o microscópio de infravermelho.

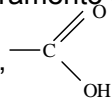
c) A espectroscopia de infravermelho pode classificar microrganismos em diferentes níveis taxonômicos, sem nenhuma pré-seleção de linhagens por algum outro critério taxonômico. Diferente de outras técnicas, ela pode ser utilizada para classificar microrganismos em linhagens, gênero e espécie. A especificidade do método é geralmente extremamente alta, permitindo diferenciação das cepas em níveis de sorogrupo e sorotipo.

d) Estas vantagens tornam o método aplicável a rápida identificação de patógenos; investigações epidemiológicas, conduta de casos de estudo, triagem, resolução de cadeias de infecção, terapias de controle e detecção de infecções recorrentes, controle de processos biotecnológicos, controle de qualidade microbiológico e ainda na indústria farmacêutica e de alimentos.

e) É possível a detecção de componentes específicos da célula *in situ* (por exemplo, armazenamento de materiais, formação de esporos, encapsulação do microrganismo) e a resistência e interação célula-droga podem ser monitoradas e caracterizadas.

Esforços para interpretar os espectros em infravermelho de moléculas biológicas são baseados principalmente na análise de estruturas conhecidas. Ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e carboidratos estão constantemente presentes em diferentes quantidades de uma grande diversidade de células microbianas. A tabela 1, traz algumas bandas do infravermelho e suas atribuições.

Tabela 1 – Atribuições de algumas bandas freqüentemente encontradas em espectro de infravermelho microbiano.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
~3500	O-H estiramento de grupos hidroxil
~3200	N-H estiramento (amida A) de proteínas
2959	C-H estiramento (assimétrico) de CH ₃
2934	C-H estiramento assimétrico de >CH ₂
2921	C-H estiramento assimétrico de >CH ₂ em ácidos graxos
2898	C-H estiramento de →C-H metino
2872	C-H estiramento (simétrico) de –CH ₃
2852	C-H estiramento (simétrico) de >CH ₂ em ácidos graxos
1741	>C=O estiramento de ésteres
1715	>C=O estiramento de ésteres, RNA/DNA, 
~1695	Componentes da banda de Amida I
~1685	
~1675	Estrutura β-pregueada de proteínas
~1655	Amida I de estruturas α-helical
~1637	Amida I de estruturas β -
1548	Amida II
1515	Banda de tirosina
1468	C-H deformação de >CH ₂
~1400	C=O estiramento (simétrico) de COO-
1310-1240	Banda de Amida III componentes de proteínas
1250-1220	P=O estiramento (assimétrico) de >PO ₂ ⁻ fosfodiésteres
1200-900	C-O-C, C-O dominado por vibrações do anel de carboidratos C-O-P, P-O-P
1085	P=O estiramento (simétrico) de >PO ₂ ⁻
720	C-H "rocking" de >CH ₂
900-600	Região de impressão digital

Adaptado de Naumann et al., 1991

2.3.2 Perspectivas para a espectroscopia de infravermelho em microbiologia

A principal vantagem da espectroscopia de infravermelho, e a qual a torna atrativa, é a sua extrema rapidez quando comparada com técnicas convencionais, a sua aplicabilidade uniforme para diversos microrganismos, e a sua elevada especificidade, a qual permite a diferenciação que alcança até os níveis de subespécies. O poder da espectroscopia de infravermelho está na capacidade de conduzir estudos de casos epidemiológicos e grandes experimentos de triagem muito rapidamente. Em alimentos, água e indústria farmacêutica, esta técnica pode contribuir para melhorar o controle de qualidade microbiológico. Para o controle de processos de biotecnologia a espectroscopia de infravermelho se mostra como uma alternativa ou técnica adicional aos instrumentos analíticos já existentes. A perspectiva para a utilização de microscopia de FTIR na caracterização de microrganismos é muito promissora (Naumann, 2000).

As técnicas amostrais, os procedimentos espectroscópicos e as estratégias de avaliação dos dados no contexto da espectroscopia de infravermelho podem ser facilmente utilizados para caracterizar outros microrganismos, tanto protozoários unicelulares como as amebas, assim como os vírus e igualmente plantas ou células e tecidos de mamíferos. A densidade de informações pode aumentar pela combinação do traço acessível do espectro de NIR, MIR, e FIR, nas regiões do espectro eletromagnético e pelo uso da espectroscopia de infravermelho e Raman uma após a outra. O infravermelho e FT-NIR e o espectro Raman podem ser obtidos com excelente reprodutibilidade, quando forem analisadas amostras aproximadamente idênticas de microrganismos puros. A exploração complementar da espectroscopia de infravermelho e da espectroscopia Raman particularmente, podem ser novas avenidas para aplicações biomédicas no futuro.

Mariey e colaboradores, em 2001, realizaram uma revisão da espectroscopia de

infravermelho por transformada de Fourier, como um instrumento para caracterização de microrganismos. A maioria dos artigos descritos nesta revisão relata estudos com bactérias e alguns se referem a leveduras, principalmente do gênero *Candida* e *Saccharomyces*. Somente um dos artigos descritos, foi realizado com fungos, *Trychophyton* e *Microsporium*, onde foi realizada a discriminação de 27 linhagens pertencentes a 2 espécies (Bastert et al. 1999).

2.3.3 Caracterização de microrganismos por espectroscopia no infravermelho

A utilização da espectroscopia no infravermelho tem sido relatada como ferramenta na identificação de lipase produzida por leveduras do tipo *Candida* e bactérias, como *Escherichia coli* (Natanello et al., 2005). No estudo com bactérias foi realizada a análise dos corpos de inclusão, extraídos da célula. A análise ocorreu em meio líquido, e bandas características de amida na região entre 1500 e 1700 cm^{-1} , foram encontradas. Os mesmos dados, após receberem tratamento pela segunda derivada, apresentaram banda característica de proteínas agregadas na região de 1627 cm^{-1} e uma banda de tirosina na região de 1515 cm^{-1} .

O mesmo grupo de pesquisadores realizou estudo por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (EIV-TF), para identificação de lipase em *Candida rugosa* em meio líquido. A EIV-TF demonstrou ser uma excelente ferramenta para associar a dependência da temperatura na atividade lipase.

A diversidade microbiana é sempre estrutural e bioquímica. O espectro de infravermelho em microrganismos puros produz informações sobre a estrutura e composição do conjunto celular (Naumann, 2000).

Devido aos complexos sinais espectroscópicos em códigos, fornecidos pelos espectros no infravermelho, a sobreposição de centenas ou milhares de bandas não podem ser interpretadas por qualquer medida, técnicas de reconhecimento precisam ser utilizadas, as

quais consideram o espectro como impressões digitais metabólicas (*metabolic fingerprints*), antes do que uma combinação separada de intensidades, frequências e largura de bandas (Naumann,2000).

Para análise destes dados, os químicos já utilizam a quimiometria, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. No entanto a utilização da quimiometria tem se estendido para a área microbiológica, onde a utilização de métodos espectroscópicos, como o infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), gera muitas informações. Através da quimiometria é possível correlacionar estas informações e apresentar ótimos resultados, mesmo que para muitas amostras.

2.4 Quimiometria

2.4.1 Aspectos gerais

O objetivo das análises fatoriais é extrair informações essenciais de um grande conjunto de dados misturados e formular uma classificação dos semelhantes. Os objetos ou informações são primeiramente representados como pontos no espaço hiperdimensional, utilizando-se para isso tantas dimensões quanto há de propriedades a serem analisadas (Naumann, 2000).

No caso de análises realizadas através da espectrometria de infravermelho, inicia-se com uma base de dados, onde a série espectral de interesse é selecionada e então eventualmente filtrada pelo cálculo da primeira ou segunda derivada. Finalmente o espectro é normalizado (Naumann, 2000).

A meta da análise fatorial é calcular, através de um vetor ou valor específico, um novo sistema coordenado de variância, o qual está adaptado às características estruturais do grupo de dados (Naumann, 2000).

Os vetores ortogonais do novo sistema coordenado representam informações sobre as características estruturais do complexo grupo de dados. Os objetos podem ser representados no novo sistema coordenado de variância como uma função de propriedades específicas de todo o grupo de dados, sendo melhor do que uma função de absorbâncias ou frequências. Normalmente, os primeiros 2 a 24 vetores ortogonais do novo sistema coordenado representam, de forma decrescente, a maior parte da variância dos espectros (Naumann, 2000).

2.4.2 Ferramentas quimiométricas

Nos últimos anos foram desenvolvidas várias ferramentas quimiométricas de grande utilidade para análise qualitativa e quantitativa de compostos em função de sua estrutura e atividade. Entre os métodos mais utilizados podem ser citadas:

- Análises Exploratórias: Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) e Análise por Componentes Principais (PCA);
- Métodos de Regressão: Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão por Componente Principal (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (Ferreira, 2002).

O HCA um importante método de análises multivariadas, o qual tem como objetivo principal a organização dos dados de maneira a enfatizar seus agrupamentos naturais e padrões, através do cálculo da similaridade. Os resultados, de caráter qualitativo, são apresentados na forma de um dendograma, o qual permite a visualização das amostras ou variáveis no espaço bidimensional (Ferreira, 2002).

O PCA é um método de “compressão” de dados que se baseia na correlação de variáveis. Tem por objetivo o agrupamento de variáveis correlacionadas, substituindo o conjunto total de variáveis por um novo conjunto denominado de “Componentes Principais”, nos quais os dados são projetados. É a ferramenta de maior aplicação na análise de dados químicos,

quando estes são, por natureza, multivariados (Ferreira, 2002; Brereton, 2003).

A PCA, consiste na manipulação de dados, expresso na forma de matriz, com o objetivo de apresentar as variações presentes, através de um número de componentes principais (também denominado de fatores ou variáveis) através de um número menor de componentes principais. Estes fatores representam um novo sistema de eixos que representam as variáveis originais num espaço com dimensões contraídas em relação ao espaço original, sendo que cada fator agrupa aquelas variáveis que estão altamente correlacionadas e a variação presente em cada fator é complementar aos demais fatores (são vetores ortogonais) (Brereton, 2003).

As novas coordenadas do conjunto de dados passam a ser denominadas de “scores” sendo que cada fator é uma combinação linear das variáveis originais onde cada coeficiente da combinação linear é denominado de “loadings” (Brereton, 2003).

A construção de modelos de calibração passa então por uma etapa de seleção das variáveis que irão servir de matriz de dados para a geração de diversos fatores a partir dos quais são criados modelos de calibração.

Tanto o método PCR quanto o método PLS podem ser utilizados para a modelagem por componentes principais. Em ambos os parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no modelo de calibração (Ferreira et al., 1999).

O primeiro constrói as componentes utilizando apenas as respostas instrumentais, desconsiderando informações relacionadas com as respostas biológicas (atividade lipase). Esta característica pode significar a fragilidade do método para aqueles casos em que algumas frequências apresentam baixa absorvância espectrais para algumas amostras em estudo (Ferreira et al., 1999).

O método PLS contorna esta dificuldade característica do PCR utilizando as informações das respostas biológicas. Neste caso o primeiro fator é denominado de variável latente e descreve a direção de máxima variância que também se correlaciona com a resposta biológica.

Estas variáveis latentes são na verdade combinações lineares das componentes principais calculadas pelo método PCR. Um fator que pode comprometer a qualidade do modelo de PLS é o de que se alguma das respostas biológicas não apresentar determinação confiável, desta forma o modelo pode ficar calibrado de maneira errada.

Uma vez feita a seleção das variáveis e escolha do modelo, estes devem ser submetidas à validação estatística. O primeiro passo é a verificação do grau de ajuste do modelo através do cálculo do coeficiente de correlação r_{Cal} e do desvio padrão RMSEC (do inglês *Root Mean Square Error of Calibration*), análise do gráfico dos resíduos da regressão em função da atividade observada. Por fim analisa-se a verificação do grau de previsibilidade do modelo através da execução do teste de validação cruzada e do cálculo do coeficiente de correlação (r_{Val}) e do desvio padrão RMSEV (do inglês *Root Mean Square Error of Validation*) das previsões (Brereton, 2003).

A decisão sobre o número de variáveis latentes a serem considerados no modelo de calibração será dada em função do menor valor da soma dos quadrados dos erros de previsão (PRESS) ou a sua raiz quadrada (RMSEV).

As curvas de PRESS para um modelo de validação são semelhantes às de RMSEV uma vez que os modelos de PRESS e de RMSEV estão relacionados pela expressões:

$$PRESS = \sum (Y - \hat{Y})^2$$

$$RMSEV = \frac{(PRESS)^{1/2}}{n - k - 1}$$

$$r_{Val}^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y - Y_M)^2}$$

onde:

Y = valor determinado experimentalmente para um determinado composto

\hat{Y} = valor previsto para um determinado composto

Y_M = média de valores medidos experimentalmente para um conjunto de compostos testados

n = nº de compostos

k = nº de fatores

Curvas de coeficiente de Correlação de Validação (rVal) devem se aproximar de 1 com a inclusão de novos fatores até que um maior nº de fatores não leve a uma melhor qualidade no modelo. Valores de rVal são sempre menores que valores de Coeficiente de Correlação de Calibração (rCal) o mesmo acontecendo com o erro padrão de calibração (RMSEC), uma vez que perde-se informação com a exclusão de um composto do modelo de validação cruzada. Logo, bons modelos de validação são sempre bons modelos de calibração fazendo com que os parâmetros estatísticos (RMSEV, PRESS e rVal) dos modelos de validação sejam mais confiáveis para a escolha do melhor candidato a modelo (Ferreira, et al., 2002).

Para comparar de forma estatística os modelos que apresentam o menor RMSEV, emprega-se o teste F.

Os valores de $F(i,j)$ para os melhores valores de RMSEV são calculados empregando-se a expressão a seguir, na qual i e j representam o número de amostras de validação empregado em cada modelo.

$$F(i,j) = \frac{(\text{RMSEV}_i)^2}{(\text{RMSEV}_j)^2}$$

Quando $F(i, j)$ for maior que F crítico, os modelos comparados apresentam

desempenhos significativamente diferentes, caso contrário o desempenho dos modelos são equivalentes.

Um outro parâmetro que se costuma utilizar para acompanhar o nível de informação fornecido pelos fatores é a Variância Acumulada (VA) que mede, em percentagem a quantidade de variância incluída em cada fator criado pelo método PLS. Normalmente, a maior variância é apresentada pelo primeiro fator com decréscimo rápido da variância nos fatores subseqüentes.

Outro fator a ser considerado na etapa de validação do modelo é a eliminação das amostras anômalas (outliers) que, tão importante quanto à determinação do nº de fatores ótimos, permite assegurar que um conjunto homogêneo de respostas biológicas foi utilizado para a geração do modelo eliminando-se aquelas respostas que são solitárias (Ferreira, et al., 1999).

Entre os métodos de regressão, o PCR se mostra similar ao PCA devido à decomposição dos dados em uma matriz de componentes principais (matriz X), possuindo ainda, como diferencial, a etapa de regressão linear (Ferreira, 2002; Brereton, 2003).

A regressão por PLS realiza uma correlação entre a matriz X, de variáveis independentes, e um vetor Y, o qual representa uma variável dependente. Neste caso, a validação do modelo ocorre através de um procedimento interno de validação cruzada no qual as amostras são excluídas alternadamente (Ferreira, 2002; Brereton, 2003).

A validação cruzada contribui para a determinação do número de variáveis latentes significantes para a modelagem, possibilitando a redução do ruído gerado pelas variáveis latentes de menor importância (Brereton, 2003).

No modelo PLS, há algumas suposições feitas em torno dos dados que serão analisados. As informações espectrais, comumente analisadas por esta ferramenta, e as informações das respostas biológicas (variáveis dependentes) são usadas ao mesmo tempo na fase de calibração (Adams, 1995).

Todos os métodos quimiométricos são influenciados pelo pré-processamento e pelo tratamento conferido aos dados, os quais são utilizados na preparação da informação para a aplicação dos algoritmos matemáticos (Brereton, 2003).

Entre os pré-processamentos disponíveis tem-se a centralização na média e o auto-escalamento, sendo que o primeiro consiste em subtrair os valores médios calculados para cada variável de cada uma das variáveis correspondentes, e o segundo consiste em centrar os dados na média e dividi-los pelo seu desvio padrão, de forma que todas as variáveis passam a ter a mesma importância (Massart, 1988).

Entre as técnicas de tratamento de dados destaca-se a correção do espalhamento de luz (MSC), muito aplicada na modelagem de dados espectrais devido a sua capacidade de corrigir o efeito do espalhamento de luz presente nos espectros obtidos por técnicas de reflexão, o qual é causado principalmente pela falta de homogeneidade ótica das amostras (Ferrão, 2003).

A normalização também é um método de tratamento de dados de vasta aplicação, possibilitando a conversão dos dados para uma mesma escala e assim garantindo que a o grau de importância e influência das variáveis não seja subestimado ou superestimado (Ferrão, 2003).

Análises quantitativas biológicas podem ser realizadas através de modelos matemáticos que relacionam o espectro de infravermelho às concentrações de analito testadas. Entre as ferramentas multivariadas de maior utilização temos o PLS e o PCR (Kansiz, 2000).

O PLS é considerado um excelente método para análises quantitativas de sistemas biológicos apesar de não interpretar de forma eficiente a importância dos comprimentos de onda apresentados no espectro de infravermelho (Ellis, 2002).

A utilização de técnicas convencionais associadas a espectroscopia no infravermelho, já utilizada na identificação e caracterização de microrganismos, nos remete para uma nova

abordagem na classificação de agentes da cromoblastomicose. Neste sentido justifica-se a nossa proposta de comparar métodos tradicionais utilizados na caracterização da atividade enzimática, crescimento da cepa em meio de cultivo específico e posterior confirmação por análise em infravermelho, visando futuramente avaliar se o perfil enzimático das amostras em questão, que pode estar relacionado com aspectos da virulência e da patogenicidade desta classe de agentes infecciosos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Propor um modelo quimiométrico de caracterização enzimática, de agentes da cromoblastomicose através de métodos potenciométricos e colorimétricos associados à Espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS).

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil de atividade de algumas enzimas extracelulares, tais como, DNase, urease, gelatinase, amilase, lipase e fosfolipase em agentes de cromoblastomicose;
2. Aplicar a Espectroscopia no Infravermelho para discriminar agentes de cromoblastomicose através da sua impressão digital metabólica;
3. Caracterizar a fisiologia do crescimento de agentes da cromoblastomicose, buscando correlacionar biomassa, e atividade lipase nos agentes etiológicos de maior prevalência;
4. Avaliar a previsão de atividade lipase extracelular ligada a biomassa de agentes de cromoblastomicose através de Espectroscopia no Infravermelho e Quimiometria.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J. *Chemometrics in analytical spectroscopy*. Wolverhampton: University of Wolverhampton, 1995.

ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*, 4^a ed. John Willey & Sons, INC. New York, 1996.

ALVAREZ-MACARIE, E. AUGIER-MAGRO, G. J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding na esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities whit lipases. *Biotechnol. Lett.*, 1999, 21, 313-319.

BALINA, P; BOSA, P; NEGRONI, P.M. Un caso de chromoblastomycosis, autoctone de Argentina. *Rev. Argent Dermat.*, 1932, 16, 369-379.

BARROS, T.F.; RESENDE, M.A. Partial chemical characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1999, 41, 343-350.

BASTERT, J.; KORTING, H.C.; TRAENKLE, P.; SCHMALRECK, A F. *Mycoses*, 1999, 42, 525.

BAYLES, M.A.G. Cromomycosis-treatment whit thiabendazole. *Arch. Dermat.*, 1971, 104, 476-480.

BRERETON, Richard G. *Chemometrics – Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003, 489p.

BRUNE, A. K.; AND GÖTZ, F. Microbiological degradation of natural products. Ed. Winkelman, G., 1992, 243-266.

BRYGOO, E. R.; & DESTOMBES, P. Epidemiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull. Inst. Pasteur*, 1976, 74, 219-243.

BOPP, C. Cromoblastomicose. Porto Alegre, 1959 (Tese, Livraria O Globo).

BUCLEY, H.R.; MURRAY, I.G. Precipitating antibodies in Chromomycosis. *Saboraudia*, 1966, 5, 78-80.

CALIGIORNE, R. B., RESENDE, M.A.; OLIVEIRA, R.C.B.W., VALÉRIO, H.M., CORDEIRO, R.A., AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1999, ano 2 vol. 11, 22 - 25.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S.P.; TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen for immunodiffusion testes. *J. Clin. Microb.*, 1988, 26, 2147-2151.

CASTRO, R.M. & CASTRO, L.G.M. On the priority of description chromomycosis. *Mykosen.*, 1978, 30, 397-403.

COOPER, B.H; SCHNEIDAU, J.D. A serological comparison of *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladosporium carrionii* using immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Saboraudia*, 1970, 8, 217-226.

COSTA, J.M.; CORBELLINI, V.A.; SCROFERNEKER, M.L. Study of different nitrogen sources in glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultured in tricyclazole. *Process Biochemistry*, 2004, 39, 633-636.

COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*, 2000, 38, 73-76.

ELLIS, D. et al. Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Applied and Environmental Microbiology*, United Kingdom, 2002, 68, 2822-2828.

ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; DIXON, D.; GOLDSON, D. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*. *J. Clin. Microb.*, 1986, 23, 305-310.

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMACEL, E. R.; & PACARRERE, J. L. Forty years of cromoblastomycosis in Madagascar: A review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 55, 45-47.

FERRÃO, M. F. Análise exploratória aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. *Tecnológica*, Santa Cruz do Sul, 2003, 7, 69-88.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. São Paulo, 2002, 13, 742-753.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. *Quim. Nova*, 1999, 22, 724.

FERREIRA, M.M.C.; MONTANARI, C.A.; GAUDIO, A.C. Seleção de Variáveis em QSAR. *Quim. Nova*, 2002, 25, 439.

FISCHER, F., COOK N.B. Micologia: Fundamentos e Diagnóstico. Trad: FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda. 2001, 337p.

FONSECA, O.; LEÃO, A.E.A. As chromoblastomycoses. *Rev. Med. Cir., bras.* 1930, 38, 216-236.

FREYDIERE, A.-M.; GUINET R.; & BOIRON P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.*, 2001, 39, 9-33.

FUNDORA, F. P.; ALBAJÉS, C. R. Cromomicosis: quince años de incidência. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.*, 1989, 27, 285-292.

GOMES, M.H.R.; RESENDE, M.A. *Fonsecaea pedrosoi* lipid composition and determination of susceptibility to anphotericin B. *Can. J. Microbiol.*, 1992, 30, 37-40.

GRANJA, A.N.; SILVA, C.N.P.; COSTA, J.M.L; SILVA, R.R.; MARQUES, S.G. Correlação da apresentação clínica e histopatológica de 60 casos de cromoblastomicose, São Luís-MA. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2000, 33, 232.

GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. 2^a ed. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1994.

GULOMOVA, K.; ZIOMEK, E.; SCHRAG, J. D.; DAVRANOV, K.; CYGLER, M. Purification and characterization of a *Penicillium* sp. lipase which discriminates against diglycerides. *Lipids*, 1996, 31, 379-384.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Review – Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, 37, 63-71.

HELM, D., LABISCHINSKI H., SCHALLEHN, G., NAUMANN, D., *J. Gen. Microbiol.*, 1991, 137, 69.

HELM, D., LABISCHINSKI H., SCHALLEHN, G., NAUMANN, D., *J. Microbiol. Methods.*, 1991, 14, 127.

IWATSU, T.; MIYALI, M.; TAGUCHI, H.; OKAMOTO, S.; KURITA, N. Skin test-active substance prepared from culture filtrate of *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia*, 1979, 67, 101-105.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 390-397.

KADEMI, A.; AÏT-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L.; BARATTI, J. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54, 173-179.

KANSIZ, M.; BILLMAN-JACOB, H.; MCNAUGHTON, D. Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. *Applied and Environmental Microbiology*, Australia, 2000, 66, 3415-3420.

KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Specific and rapid identification of medical important fungi by exoantigen detection. *Ann. Rev. Microb.*, 1987, 41, 209-225.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. *Micologia Médica: Texto & Atlas*. 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 256p.

KIM, E. K.; JANG W. H.; KO, J. H.; KANG, J. S., NOH, M. J.; YOO, O. J. Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas* sp. Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 5937-5941.

KNEIPP, F.L.; PALMEIRA F.V.; PINHEIRO A. A S.; ALVIANO S.C.; ROZENTAL S., TRAVASSOS R. L.; & MEYER-FERNANDES, R.J. Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. *Medical mycology*, 2003, 41, 469-477.

KOUKER, G. L.; JAEGER, K.-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 211-213.

KWON-CHUNG, K.J.; LEHMAN, D.; GOOD, C.; MAGEE, P.T. Genetic Evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 1985, 49, 571-575.

LACAZ, C.S.; ZAMITH, V.A.; SALEBIAN, A.; GONZAGA, M. Reação intradérmica ao antígeno EP-1 de *Fonsecaea pedrosoi*. *Ann. Bras. Dermatol.*, 1982, 57, 185-187.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; *Micologia Médica: Fungos actinomicetos e algas de interesse médico*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 1991, 373-386.

LANE, C.G. A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. *J. Cutan. Dis.*, 1915, 33, 840-846.

LAWRENCE, R. C.; FRYER, T. F.; REITER, B. Rapid Method for the Quantitative Estimation of Microbial Lipases. *Nature*, 1967, 213, 1264-1265.

LI, R.. WANG, D. & RAMOS, C. D. Dematiaceous fungal infections in China. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 1994, 6, 283-305.

LOPES, C.F.; ALVARENGA, R.J.; CISALPINO, E.O.; MARTINELLI, B.; SANTOS, P.V.; ARMONDS, S. Tratamento da Cromomicose pela 5 fluorocitosina. *O hospital*. 1969, 75, 189-194.

LOPES, C.F.; CISALPINO, E.O.; ALVARENGA, R.J.; SEBASTIÃO, A.; PORTO, R.V.; MAIA, F.A.; PEIXOTO, Y. Treatment of Chromomycosis with 5-fluorocytosine. *Int. J. Dermatol.*, 1971,10,182-191.

MACDONALD, F.; ODDS, F.C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol.*, 1983, 129, 431-438.

MARIEY, L.; SIGNOLLE, J.P.; AMIEL C.; TRAVERT, J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy.*, 2001, 26, 151-159.

MARTINI, J.P.; COSTA, H.C.; SOUZA, L.C.D. Crescimento rápido da cromomicose (*Fonsecaea pedrosoi*) utilizando eucalipto (*eucalyptus* sp) como meio de cultivo. *Salus Vita.*, 1986, 5, 72-82.

MASCLAUX, F.; GUÉRO, E.; DE HOOG, G. S. & CHRISTEN, R. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (Xylohypha) species inferred from partial LS rRNA sequences. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, 33, 327-338.

MASSART, D. L.; et al. *Chemometrics : A textbook*, v. 2. Amsterdã : Editora Elsevier, 1988.

MCGINNIS, MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1983, 8, 1-16.

MEDLAR, E.M. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J. Med. Res.*, 1915, 32, 507-522.

MERIIN, J.A. Weitere beobachtungen uber den erreger der eropdischen chromoblastomykose. *Arch. Derm. Syph.*, 1932, 166, 722-729.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C.D.; MALLMANN, L.F.; EDELWEISS, M.I.; SCROFERNEKER, M.L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, 44, 585-592.

NATANELLO, A.; AMI D.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; DOGLIA M.S. secondary scruture, conformational stability and glycosylation of a recobinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.*, 2005, 385, 511-517.

NAUMANN, D.; LABISCHINSKI H.; GIESBRECHT P. The carактерization de micoorgsnisms by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT/IR), in modern techniques for rapid microbiological analysis, ed. W.H. Nelson, VCH, New York, 1991p., 43-96.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers, R.A. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000, 102-131.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers, R.A. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000, 1-29.

NELSON, W. H. Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, VCH, New York, 1991.

NORRIS, K. P. Infrared Spectroscopy and its Application to Microbiology. *J. Hyg.*, 1959, 57, 326-345.

NSANZUMUHIRE, H., VOLLLUM, D. & POLTERA, A. A. Chromomycosis due to *Cladosporium trichoides* treated with 5-Fluorcytosine. *American Journal of Clinical Pathology*, 1974, 61, 257-263.

OLIVEIRA, L.G. Experiência com antígeno metílico e cromomicina no diagnóstico da cromomicose. *Arq. Cent. Est. Fac. Odontol.*, 1969, 6, 253-260.

OLIVEIRA, L.G. Isolamento e identificação dos agentes da cromomicose em Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Trop.*, 1972, 7, 07-10.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999, 29, 119-131.

RESENDE, M.A. Metabolismo oxidativo de formas de cultura de *Fonsecaea pedrosoi* (Brumpt) Negróni, 1936, Belo Horizonte, 1975 (Tese – Instituto de Ciências Biológicas, UFMG).

RIDDLE, J. W.; KABLER, P. H.; KENNER, B. A.; BORDNER, R. H.; ROCKWOOD S. W.; STEVENSON, H. J. R. Bacterial Identification by Infrared Spectrophotometry. *J. Bacteriol.*, 1956, 72, 593-603.

RIPPON, J. W. Extracellular collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. *Journal of Bacteriology*, 1968, 95, 43-46.

RIPPON, J.W. Chromoblastomycose. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. *Medical Mycology*, 1988, 276-296.

RIPPON, J.W.; VARADI, D.P. The elastase of pathogenic fungi and actinomycetes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1968, 50, 54-58.

SHARMA, N. L.; SHARMA, R. C.; GROVER, P. S.; GUPTA, M. L.; SHARMA, A. K.; & MAHAJAN, V. K. Chromoblastomycosis in India. *Int. J. Dermatol.*, 1999, 38, 846-851.

SHIMIZU, M. T.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C. S.; FANTINATO, V. & PAULA C. R. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. *J. of Med. & Vet. Mycol.*, 1995, 33, 27-31.

SIDRIM, J.J.C.; MORERIRA, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999. 287p.

SIESENOP, U. & BÖHM, K.H. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. *Mycoses*, 1995, 38, 205-9.

SILVA, J.P.; SOUZA, W, ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*, 1999, 143, 171-175.

SILVEIRA, V.D. *Micologia* 4ª ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981, 332 p.

SMITH, C.E.; WHITING, E.G.; BAKER, E.E.; ROSEMBERGER, H.G.; BERAD, R.R.; SOITO, M.T. The use of Coccidioidin. *Amer. Ver. Tuberc.*, New York, 1948, 57, 330-360.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G. M.; STEINER, W. and READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds, *J. Biotechnol.*, 1999, 75, 117-126.

TAN, Y. and MILLER, K. J. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B 52, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58, 1402-1407.

VIANI, F.C.; SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; LARSON, C.E.; GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. *Medical Mycology*, 2001, 39, 463-468.

VIDAL, M.S.M; CASTRO, L.G.M.; CAVALCANTE, S.C.; LACAZ, C. S. Estudo de um antígeno de *Fonsecaea pedrosoi* para o sorodiagnóstico da cromoblastomicose causada por este fungo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2002, 35, 218.

VILLABA, E. Detection of antibodies in the sera of patients with chromoblastomycosis by counter immunoelectrophoresis. -I.- Preliminary results. *J. Med. Vet. Mycology*, 1988, 23, 73-74.

VILLABA, E.; YEGRES, J.F. Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblastomycosis by *Cladosporium carrioni* using double immunodiffusion. *Mycopathologia*, 1988, 102, 17-19.

VILELLA, E.; JOVEN, J. In vitro measurement of lipoprotein and hepatic lipases. *Methods Mol Biol*, 1998, 110, 243-251.

WINDGASSEN, M.; URBAN, A. ; and JAEGER, K. E. Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 193, 201-205.

ZAMBRANO, E.A.; RODRÍGUEZ, I.; MENDONZA, M.; SANTAELLA, C.; LÓPEZ, M.; DÍAZ, E. & ALBORNOZ. Regulation of serine-type exoproteinases by endogenous inhibitors present in exoantigens of mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 2001, 359-368.

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF CHROMOBLASTOMYCOSIS AGENTS

*Juliana Mônica da Costa*¹; *Thais Furtado de Souza*²; *Maria Lúcia Scroferneker*^{2,1};
Valeriano Antonio Corbellini^{3,1}

¹Post Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, State of Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, State of Rio Grande do Sul, Brazil

^{3,1}Department of Physics and Chemistry of Universidade de Santa Cruz do Sul; State of Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

The gelatinase, urease, amylase, lipase, phospholipase and DNase activities of a group of chromoblastomycosis agents constituted by strains of *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantiana* and *Exophiala jeanselmei* were analysed and compared. All strains presented urease, gelatinase and lipase activity. Phospholipase activity was detected only on five of six strains of *F. pedrosoi* analysed. Amylase and DNase activities were not detected on the strains studied. Lipase and phospholipase activities, quantified by the ratio between colony diameter and precipitation halo by substrate uptake, changed significantly during the analysed period (10 days), showing varied behaviour of the strains. Lipase and phospholipase activities showed the best potential as enzyme markers to differentiate chromoblastomycosis agents and to correlate with the pathogenicity of this infection.

Keywords: Chromoblastomycosis, enzymatic characterization, lipase activity, phospholipase activity

1. INTRODUCTION

Chromoblastomycosis is a chronic disease that occurs after traumatic inoculation of different strains of dematiaceous fungi into the subcutaneous tissue. The disease occurs mainly among male agricultural labourers in tropical and subtropical countries, and primarily affects the lower limbs (McGinnis, 1983; Richard-Yegres & Yegres, 1992). In Brazil, the most frequent aetiological agents are *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* and *Cladosporium carrionii* (Silva et al., 1999; Scroferneker et al., 2000). More rarely, *Fonsecaea compacta*, *Exophiala jeanselmei* and *Rhinocladiella aquaspersa* can also be isolated.

Chromoblastomycosis agents are a group of closely related black fungi of the *Herpotrichelaceae* family (Caligiorne, 1999). Despite the similarity of macromorphological aspects of this group, due to the deposition of DHN-melanin (Bell & Wheeler, 1986; Taylor & Wheeler, 1987), or due to the tissue form in the human host, some aspects of their morphophysiology show that they can be differentiated using different laboratory methods. The mycological exam on SDA modified with cycloheximide allows differentiating patterns of conidial development (Lacaz, Porto & Martins, 1998, Sidrim & Moreira, 1999); biochemical and cultural methods allow differentiating species in terms of growth and nutrients uptake upon the action of intrinsic and extrinsic factors (Martini, Costa & Souza, 1986; Fischer and Cook, 2001); immunological methods permit differentiating some genera related to exoantigens and skin tests (Iwatsu et al., 1982; Barros & Resende, 1999) having more interest on differential diagnosis concerning other agents of cutaneous granulomatous lesions. More recently, molecular typing methods based on patterns of DNA fragmentation have shown phylogenetic similarities among some genera (Attili, De Hoog & Pizzirani-Kleiner, 1998; Caligiorne et al, 1999).

Biochemical methods for the differentiation of chromoblastomycosis species are more widely used by research laboratories than by clinical laboratories, despite their importance to the differential diagnosis of other dematiaceous fungi. The analysis includes differential growth at 25 and 37 °C, sensitivity to cycloheximide, as well as enzyme assays related to the uptake of casein, gelatin, nitrate, and tyrosine. Other biochemical assays are not as common and their potential role in the differentiation of these classes of fungi has not been evaluated yet.

The characterization of clinical isolates of pathogenic fungi, especially of chromoblastomycosis agents, is important due to the fact that some extracellular enzymes are related to the virulence and pathogenicity of mycotic infections. This is the case of proteases, lipases, and phospholipases.

In the present study, we investigated the activity of six hydrolytic enzymes of some strains of chromoblastomycosis agents. Our objective was to analyse new and potential enzyme biomarkers to characterize, differentiate and classify species of these fungi to be applied in future studies for the clarification of virulence and pathogenicity of clinical lesions and to be used as new diagnostic methods for this pathology.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Storage and cultivation of strains

Strains of chromoblastomycosis agents were obtained from the Laboratory of Pathogenic Fungi of the Department of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and stored on Sabouraud agar slants at 25 °C

containing *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, ATCC 46422, IMTSP 49, IMTSP 674, IQE 444.62 (19)*, MA; *F. compacta* IMTSP. 373; *Phialophora verrucosa* FMC.2214 (8); *Cladosporium carrionii* IMTSP. 680; *Cladophialophora bantianum* 2907-78 (13); *Exophiala jeanselmei* CROMO.HC8 (45).

Candida albicans ATCC 10231 *Malassezia furfur* IMTSP. 225, *Nocardia brasiliensis* IMTSP. 739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as positive controls in the enzyme assays. For all enzyme assays, the strains were previously cultured for 14 days in Sabouraud agar slants at 25 °C.

2.2 Qualitative assays

Qualitative assays were carried out to determine gelatinase, urease, and amylase activities.

Gelatinase assay: strains were grown in tubes containing 5 mL of test medium according to the method reported by Rij 1984, and Kutzman & Fell 1998. The strains were considered negative when the medium remained solid. They were considered positive when the gelatin liquefied and there was fungal growth. *Nocardia brasiliensis* IMTSP 739 was used as positive control.

Urease assay: Urease activity was determined according to the method proposed by Rij 1984, and Kutzman & Fell 1998. The strains were grown for 7 days at 25 °C. The strains were considered negative when the culture medium did not change colours and positive when the medium became pinkish. *Nocardia brasiliensis* IMTSP. 739 was used as positive control.

Amylase assay: Amylase activity was determined according to the method described by Minami et al., 2003. The strains were grown for 14 days at 36.5 °C and lugol was added to the surface of the agar plates. The strains were considered positive when clear or pinkish haloes formed around the colonies. *Nocardia brasiliensis* IMTSP. 739 was used as positive control.

2.3 Semi-quantitative assays

Semi-quantitative assays were carried out to determine phospholipase, lipase, and DNase activities.

Mycelial fragments of each strain were blended in a mortar and the cell debris were suspended in 1 mL of sterile distilled water. The suspension was added to petri dishes containing specific medium to each enzyme tested. After complete fungal growth on the surface of the agar plate (7 to 14 days), 5-mm culture discs were purchased and applied, in triplicate, onto other plates containing the specific medium. The plates were incubated for 10 days at 30 °C. Phospholipase and lipase activities were characterized by opaque haloes of calcium soap precipitate around colonies and the DNase activity, by precipitation haloes around the inoculation points. The enzyme activities of strains (Pz) were determined by the ratio between colony diameter (cd) and colony diameter plus precipitation haloes (cdp). Strains with $Pz = 1$ were considered negative, those with $Pz \geq 0.64 > 1$ were weakly positive, and those with $Pz < 0.64$ were regarded as strongly positive. The readings of fungal growth and haloes were carried out at 2, 4, 6, 8 and 10 days.

Lipase assay: The lipase assay was carried out according to the method used by MUHSIN et al., 1997; *Malassezia furfur* IMTSP. 225 was used as positive control.

Phospholipase assay: Phospholipase activity was determined according to the method described by PRICE et al., 1992; *Candida albicans* ATCC 10231 was used as positive control.

DNase assay: DNase activity was determined according to the method proposed by LOPEZ-MARTINEZ et al., 1994; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as positive control.

3 RESULTS

All strains of chromoblastomycosis agents showed a positive reaction to urease and gelatinase activity and a negative reaction to amylase activity when compared with the control strain *N. brasiliensis*. DNase activity was not observed on the evaluated strains. Fungal growth was slow and almost imperceptible when compared to the positive control *S. aureus* ATCC 25923, whose Pz = 0.290 on the 10th day.

According to phospholipase activity, the strains analysed can be placed in three groups (Figure 1). The first one, which is characterized by high phospholipase activity, includes *F. pedrosoi* MA and IMTSP. 674, in addition to positive control *C. albicans* ATCC 25923; the second group is formed by *F. pedrosoi* ATCC 46422, ATCC 46428 and IMTSP. 49, with lower lipase activity; and the third group consists of other agents characterized by no phospholipase activity, although some fungal growth was observed.

Only five strains (*F. pedrosoi* ATCC 46422, ATCC 46428, IMTSP. 49, IMTSP 674 and MA) had detectable precipitation haloes. Strains *F. pedrosoi* 674 and MA were already phospholipase producers at the first reading, where *F. pedrosoi* MA were better phospholipase producers than the positive control after the 8th day. These strains demonstrated constant phospholipase activity and radial mycelial growth. Strains *F. pedrosoi* 46128, 46422 and 49 presented precipitation haloes as of the 6th day of culture; the *F. pedrosoi* 46428 strain also demonstrated strong phospholipase activity on the 10th day, with Pz=0.625. On the other hand, the Pz value of *F. pedrosoi* MA was 0.623 on the 4th day of culture and that of *F. pedrosoi* 674 was 0.593 on the 8th day.

The statistical analysis of phospholipase activity, carried out through Student's t test for independent samples, revealed a statistically significant difference at the 95% confidence interval for *Fonsecaea pedrosoi* 674 on the 10th day of culture, *Fonsecaea pedrosoi* MA on the

6th, 8th and 10th days of culture, and for *Candida albicans* ATCC 10231 also on the 6th, 8th and 10th days of culture. There was no statistically significant difference for the remaining strains on the days of culture analysed. The values for enzyme activity obtained on the 4th, 6th, 8th and 10th days of culture were individually compared with the non-production of phospholipase, i.e., $Pz=1$.

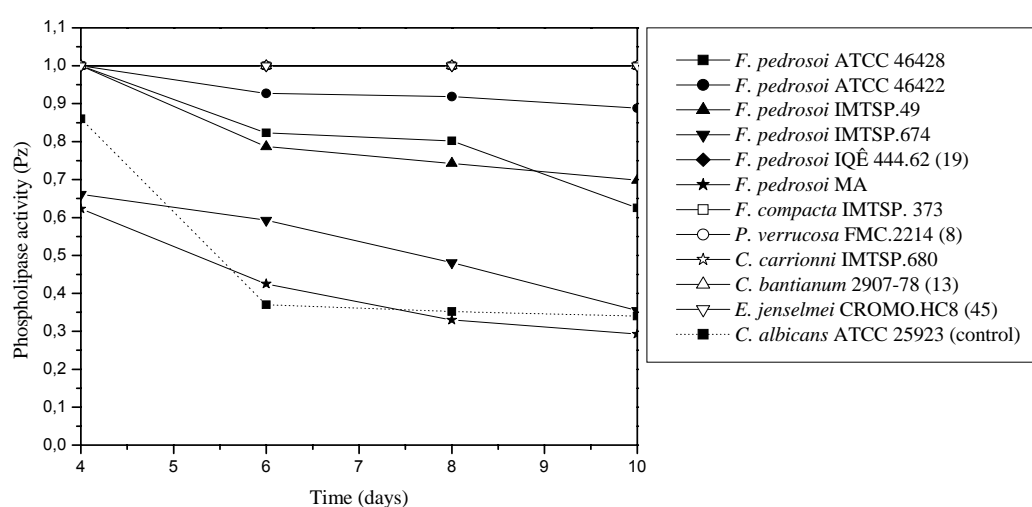


Figure 1: Time-related phospholipase activity profile (Pz) of chromoblastomycosis agents cultured on specific agar. The dotted line represents the behaviour of *C. albicans* (positive control).

All strains showed high lipase activity, and the Pz value increased with the time of culture, indicating that the haloes around colonies increase less than the precipitation haloes of calcium oleate (Figure 2) under limited nutritional conditions. After the 6th day of culture, only *F. pedrosoi* MA, IMTSP. 674, ATCC 46422 and *C. bantianum* 13 were better lipase producers than the positive control *M. furfur* IMTSP. 225.

F. pedrosoi IMTSP.674 was the strain with the largest number of haloes on the 10th day. The Pz value did not oscillate remarkably among the strains of this species (mean Pz = $0.287 \pm$

0.066), indicating homogeneity of this group, even though the strains were isolated from different places.

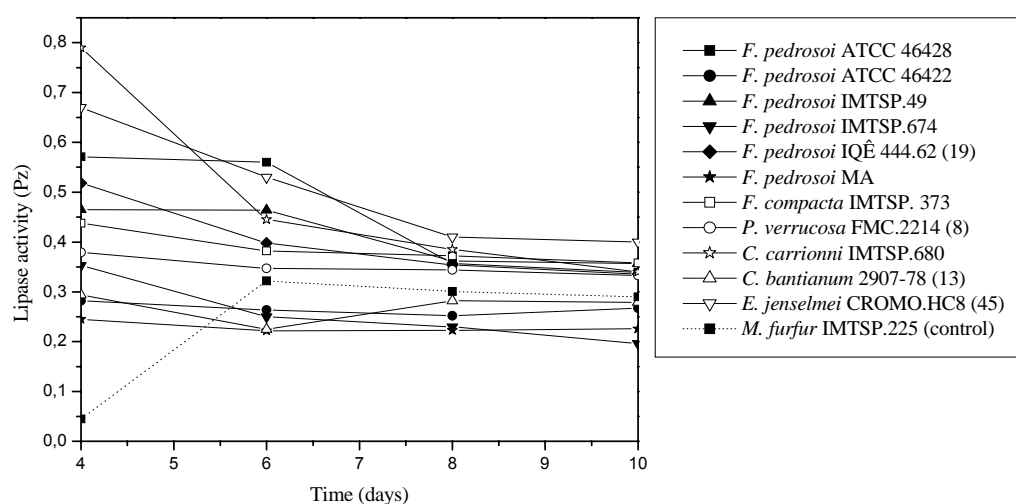


Figure 2 – Time-related lipase activity profile (Pz) of chromoblastomycosis agents cultured on specific agar. The dotted line represents the behaviour of *M. furfur* (positive control).



Figure 3 – Plate with precipitation haloes characteristic of lipase production in the presence of Tween 80 by *F. pedrosoi* MA (on the left) and by *F. pedrosoi* 46422 (on the right) at the initial growth stage, without haloes around the colonies.

Figure 3 shows the precipitation reaction produced by the *F. pedrosoi* MA strain and also a strain with negative reaction.

F. pedrosoi 46422 and MA strains presented high lipase activity at the very first reading, on the 4th day. On the other hand, these values did not show any significant changes on the 10th day, indicating that the substrate was quickly metabolised by the strain, although its slow growth reinforces the idea that Tween 80, used as carbon source, was not accumulated efficiently as biomass, thus stimulating lipase excretion by the fungus.

The same statistical analysis used for phospholipase activity was employed for lipase. Only *Fonsecaea pedrosoi* 46428 on the 4th and 6th days of culture and *Fonsecaea pedrosoi* 19, *Cladosporium carrionii* 680 and *Exophiala jeanselmei* 45 strains did not show a statistically significant difference at the 95% confidence interval.

4 DISCUSSION

DNase, urease, gelatinase and amylase were not useful in differentiating the strains analysed because they were all positive (urease and gelatinase) or negative (DNase and amylase). DNase has already been associated with virulence in dermatophytes, allowing for the discrimination between acute and chronic cases of dermatophytosis (Lopez-Martinez et al., 1994). The absence of this activity in the analysed chromoblastomycosis agents indicates that this enzyme activity is not important in explaining fungus-host interactions.

Gelatinase and urease activities are not quantified in this study, but they have a potential for differentiating chromoblastomycosis agents, since their use for this purpose has already been described, particularly for the characterization of *Cladosporium carrionii* and *Exophiala jeanselmei* (Fischer & Cook, 2001). Further investigation into these properties can be conducted in future studies.

Phospholipase has been used as a virulence marker for some pathogenic fungi such as *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Microsporium. canis* (Price, Wilkinson & Gentry, 1982; Williamson, Samaranayake & Macfarlane, 1986; Ibrahim et al., 1995; Chen et al., 1997; Maia, 1997; Kothavade & Panthaki, 1998; Vidotto et al., 1998; Ghannoum, 2000; Cox et al., 2001; Birch, Denning & Robson, 2004). Among these fungal species, clinical isolates presented more phospholipase activity than environmental isolates, showing a typing factor for the differentiation of strains with greater virulence (Ibrahim et al., 1995; Chen et al., 1997; Kothavade & Panthaki, 1998; Birch, Denning & Robson, 2004). Although the expression of phospholipase activity is a characteristic of available genetic information, stimulation of phospholipase production as response to the adaptation to the human host cannot be ruled out, which can explain the greater enzyme activity in clinical isolates.

In our study, although all strains were characterized as clinical isolates, only *F. pedrosoi* strains presented phospholipase activity, indicating a possible marker for differentiating this genus from other genera of black fungi associated with chromoblastomycosis agents. Also, there may be a possible relationship with the pathogenesis of the chromoblastomycosis because the *F. pedrosoi* MA strain, one of the best phospholipase producers, was isolated from a patient in the state of Maranhão, in North-eastern Brazil, with highly chronic and refractory lesions and resistance to conventional antifungal therapy.

The negative results of the other strains (*Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantianum*, *Exophiala jeanselmei*) do not rule out the possibility that phospholipase production may be restricted to the intracellular environment, similarly to what has been described for other pathogenic fungi (Das & Banerjee, 1977).

The lipase activity presented by the strains of chromoblastomycosis agents investigated here shows that this enzyme activity was present in all strains, but at different levels. The rapid metabolism of Tween 80 associated with high enzyme activity, without biomass accumulation,

particularly by the *F. pedrosoi* MA, IMTSP. 674 and ATCC 46422 and *C. bantianum* 2907-78 strains (13) reinforces the hypothesis that this behaviour is possibly related to the pathogenicity and virulence of these agents according to other studies, which reported an elevated rate of seborrhoeic dermatitis, to lipase production on different substrates and under pH effect, for instance on *Mallassezia furfur* (Plotkin, et al., 1996), or to the virulence of *Candida albicans* strains (Schaller et al, 2005).

Similarly to what was observed for phospholipase, greater lipase activity was also verified, frequently on isolates from chronic mycotic infections (Lopez-Martinez et al., 1994). Moreover, the *F. pedrosoi* MA strain presented high lipase activity once again, as occurred with phospholipase, strengthening the relationship between the hydrolytic potential of triglycerides and phosphoesters in chromoblastomycosis agents and activity, virulence, and pathogenicity.

The high lipase activity found in chromoblastomycosis agents can be of great value to the enzymatic characterization of other pathogenic fungi. This characteristic suggests easy penetration of these agents into the host's skin, contributing to the virulence of these isolates. Also, the higher frequency of elevated lipase activity in *F. pedrosoi* strains and *Cladophialophora bantianum* regarding other strains reinforces the possibility to use this biochemical marker for differentiating these strains from the genera *Phialophora*, *Cladosporium* and *Exophiala*. Nevertheless, further investigation is necessary to confirm these findings, with inclusion of more strains of the same species as well as of other genera (*Wangiella*, *Rhinoctadiella*). The use of lipase activity for differentiating fungal genera closely related to mycotic infection is well reported in the literature, especially concerning dermatophytes (Nobre & Viegas, 1972).

Finally, the presence of phospholipase and lipase activities, which is closely related to the virulence and pathogenicity of some infections caused by saprophytic fungi (Zeppenfeldt, Richard Yegres and Yegres, 1994), suggests a possible additional mechanism of adaptation of

chromoblastomycosis agents to aggressive environments such as the extracellular matrix of subcutaneous tissue in the human host, as already observed for melanin.

5 CONCLUSIONS

The determination of phospholipase and lipase activities in chromoblastomycosis agents has a great potential for the differentiation of these agents. These fungi have lipase production as a common characteristic, but the intensity of production depends on each isolate. Phospholipase activity seems to be a biochemical characteristic linked to the genus *Fonsecaea*, and may be indicated to differentiate this genus from other genera of chromoblastomycosis agents. Urease and gelatinase activities are a characteristic of chromoblastomycosis agents as well as lipase activity and its usefulness as a biomarker to differentiate genera of this fungi need to be further investigated. DNase and amylase are not a characteristic of chromoblastomycosis agents and can be used to differentiate these fungal groups from other black fungi.

6 REFERENCES

ATTILI, D.S., DE HOOG G.S., PIZZIRANI-KLEINER A.A. RDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *Med Mycol.* 1998, 36, 219-225

BARROS, T.F., RESENDE M.A. Partial characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1999, 41, 343-350.

BELL A.A., WHEELER M.H. Biosynthesis and functions of melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* v. 24, p.411-451, 1986.

BIRCH, M., DENNING, D.W., ROBSON, G.D. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med. Mycol.* 2004, 42, 81-86.

BRAHIM, A.S., MIRBORD F., FILLER S.G., BANNO Y., COLE G.T., KITAJIMA Y., EDWARDS J.E., NOZAWA Y., GHANNOUM M.A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1995, 63, 1993-1998.

CALIGIORNE, R. B., et al., Fungos dematiáceos. *Biocologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1999, ano 2 vol. 11, 22 - 25.

CHEN, S.C.A., MULLER M., ZHOU J.Z., WRIGHT L.C., SORRELL T.C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J. Infec. Dis.* 1997, 175, 414.

COX, G.M., McDADE H.C., CHEN S.C.A., TUCKER S.C., GOTTFREDSSON M., WRIGHT L.C., SORRELL T.C., LEIDICH S.D., CASADEVALL A., GHANNOUM M.A. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 2001, 39, 166-175.

DAS. S.K.; BANERJEE A.B. Lipolytic enzymes of *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 1977, 15, 313-323.

DE HOOG, G.S., QUEIROZ-TELLES F., HAASE, G., FERNADEZ-ZEPPEFELDT, G., ANGELIS D.A., VAN DEN ENDE A.H.G.G., MATOS T., PELTROCHE-LLACSAHUANGA H.,

PIZZIRANI-KLEINER A.A., RICHARD-YEGRES N., VICENTE V., YEGRES F. Black Fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*, 2000, 38, Suppl I, 243-250.

ESPINELL-INGROFF, A., SHADOMY S., DIXON D., GOLDSON P. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi*, and *Phialophora verrucosa*. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 23, 305-310.

FISCHER, F., COOK N.B. Micologia: Fundamentos e Diagnóstico. Trad: FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2001, 337p.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, 13, 122-43.

IWATSU, T., MIYAJI M., TAGUCHI H., OKAMOTO S. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* and *Exophiala jeanselmei*. *Mycopathologia*, 1982, 77, 59-64.

KOTHAVADE, R.J., PANTHAKI M.H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. *J. Med. Microbiol.*, 1998, 47, 99-102.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam, 1055 p., 1998

LACAZ C.S., PORTO E., MARTINS J.E.C. *Micologia médica: Fungos actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998, 445p.

LOPEZ-MARTINEZ, R., MANZANO G.P., MIER T., MENDEZ T.L.J., HERNÁNDEZ H.F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 1994, 36, 17-20.

MAIA, M.L.S. Caracterização de biótipos de *Microsporum canis* isolados de animais. São Paulo, 1997. 123p. (Dissertação: Mestrado em Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, universidade de São Paulo).

MARTÍNI, J.P., COSTA H.C., SOUZA, L.C.D. Crescimento rápido da cromomicose (*Fonsecaea pedrosoi*) utilizando eucalipto (*Eucalyptus sp*) como meio de cultivo. *Salusvita*. 1986, 5, 72-82.

MCGINNIS, MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1983, 8, 1-16.

MINANI, P. S.; *Micologia Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses*. 1rd ed., Manole, 199 p., 2003.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C.D.; MALLMANN, L.F.; EDELWEISS, M.I.; SCROFERNEKER, M.L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, 44, 585-592.

MUHSIN, T.M., AUBAID A.H., AL-DUBOON A.H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycosis*, 1997, 40, 465-469.

NOBRE, G., VIEGAS, M. M.P. Lipolytic activity of dermatophytes. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1972, 46, 319-323.

PLOTKIN, L.I., SQUIQUERA, L., MATHOV, I., GALIMBERT, R., LEONI J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur.*, *J. Med. Vet. Mycol.*, 1996, 34, 43-48.

PRICE, M.F., WILKINSON I.D., GENTRY L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 1,92, 20, 7-14.

RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F., ZEPPENFELDT G. Chromomycosis; endemia rural, laboral y familiar en Venezuela. *Rev. Iberoam. Micol.*, 1992, 9, 38-41.

RIJ, N. J. W K.-V. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, 1081 p, 1984.

SCHALLER, M.,BORELLI C., KORTING H.C., HUBE B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005, 48, 365-377.

SIDRIM J.J.C., MOREIRA J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara-Koogan, 1999, 287p.

SILVA, J.P; SOUZA, W, ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*, 1999, 143, 171-175.

TAYLOR B.E., WHEELER M.H. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. *Mycologia* v.79, p.320-322, 1987.

VIDOTTO, V., LEONE R., SINICCO A., ITO-KUWA S., CRISEO G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Micopathologia*, 1998, 142, 71-76.

WILLIANSON, M.I., SAMARANAYAKE L.P., MACFARLANE T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. *J. Vet. Med. Mycol.*, 1986, 24, 415-417.

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE

***Juliana Mônica da Costa¹; Thais Furtado de Souza²; Maria Lúcia Scroferneke^{2,1};
Valeriano Antonio Corbellini^{3,1}***

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

³Departamento de Química e Física da Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

As atividades gelatinase, urease, amilase, lipase, fosfolipase and DNase de um grupo de agentes de cromoblastomicose constituído por cepas de *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantiana* e *Exophiala jeanselmei* foram analisadas e comparadas. Todas as cepas apresentaram atividades urease, gelatinase e lipase. A atividade fosfolipase foi detectada somente em cinco das seis amostras de *F. pedrosoi* analisadas. Atividades amilase e DNase não foram detectadas nas amostras estudadas. As atividades lipase e fosfolipase, quantificadas pela razão entre o diâmetro da colônia e o halo de precipitação de assimilação do substrato, variaram significativamente durante o período analisado mostrando comportamento variado das amostras. Uma amostra de *F. pedrosoi* isolada de um paciente com resistência clínica à terapia antifúngica e elevada morbidade na evolução da doença foi a amostra com maior atividade lipase e fosfolipase. As atividades lipase e fosfolipase mostraram o melhor potencial com marcadores enzimáticos para diferenciar agents de cromoblastomicose e para correlacionar com a patogenicidade desta infecção.

Palavras-chave: cromoblastomicose, caracterização enzimática, atividade lipase, atividade fosfolipase.

1. INTRODUÇÃO

Cromoblastomicose é uma doença crônica que ocorre após a inoculação traumática de diferentes amostras de fungos dematiáceos no tecido subcutâneo. A doença ocorre principalmente entre agricultores em países tropicais e subtropicais e afeta primariamente os membros inferiores (McGinnis, 1983; Richard-Yegres & Yegres, 1992). No Brasil, o agente etiológico mais freqüente é *Fonsecaea pedrosoi* seguido por *Phialophora verrucosa* e *Cladosporium carrionii* (Silva et al., 1999; Minotto et al., 2001). Mais raramente, *Fonsecaea compacta*, *Exophiala jeanselmei* e *Rhinocladiella aquaspersa* também podem ser isolados.

Os agentes de cromoblastomicose são um grupo de fungos negros intimamente relacionados da família *Herpotrichelaceae* (Caligiorne, 1999). Apesar da similaridade dos aspectos macromorfológicos deste grupo devido à deposição de melanina-DHN (Bell & Wheeler, 1986; Taylor & Wheeler, 1987), ou devido à forma tecidual no hospedeiro humano, alguns aspectos de sua morfofisiologia mostram que eles podem ser diferenciados utilizando-se diferentes métodos laboratoriais. O exame micológico direto em SDA modificado com ciclo-heximida permite diferenciar padrões de desenvolvimento conidial. (Lacaz, Porto & Martins, 1998, Sidrim & Moreira, 1999); métodos bioquímicos e culturais permitem diferenciar espécies em termos de crescimento e absorção de nutrientes sob a ação de fatores intrínsecos e extrínsecos (Martini, Costa & Souza, 1986; Fischer e Cook, 2001); métodos imunológicos permitem diferenciar alguns gêneros com relação á ensaios de intradermoreação (Iwatsu et al., 1982; Barros & Resende, 1999) tendo maior interesse no diagnóstico diferencial de outros agentes de lesões cutâneas granulomatosas. Mais recentemente, métodos de tipagem molecular baseados em padrões de fragmentação de DNA mostraram similaridades filogenéticas entre alguns gêneros (Attili, De Hoog & Pizzirani-Kleiner, 1998; Caligiorne et al, 1999).

Métodos bioquímicos para a diferenciação de agentes de cromoblastomicose são mais amplamente utilizados em laboratório de pesquisa que por laboratórios clínicos apesar da importância para o diagnóstico diferencial de outros fungos dematiáceos. A análise inclui crescimento diferencial a 25 e 37 °C, sensibilidade à ciclo-heximida bem como ensaios enzimáticos relacionados à assimilação de caseína, gelatina, nitrato, e tirosina. Outros ensaios bioquímicos não são tão comuns e seu potencial na diferenciação desta classe de fungos ainda não tem sido avaliado.

A caracterização dos isolados clínicos de fungos patogênicos especialmente de agentes de cromoblastomicose é importante devido ao fato de que algumas enzimas extracelulares estão relacionadas à virulência e à patogenicidade de infecções micóticas. Isto é o caso de proteases, lipases e fosfolipases.

No presente estudo nós investigamos a atividade de seis enzimas hidrolíticas de algumas amostras de agentes de cromoblastomicose. Nosso objetivo foi analisar novos marcadores enzimáticos potenciais para caracterizar e diferenciar e classificar espécies destes fungos para serem aplicadas em estudos futuros de elucidação de virulência e patogenicidade de lesões clínicas e para serem usados como novos métodos diagnósticos para esta patologia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Armazenamento e cultivo de amostras

Amostras de agentes de cromoblastomicose foram obtidos do laboratório de fungos patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e armazenados em ágar Sabouraud a 25 °C As

amostras foram *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, ATCC 46422, IMTSP 49, IMTSP 674, IQE 444.62 (19)*, MA; *F. compacta* IMTSP. 373; *Phialophora verrucosa* FMC.2214 (8); *Cladosporium carrionii* IMTSP. 680; *Cladophialophora bantianum* 2907-78 (13); *Exophiala jeanselmei* CROMO.HC8 (45); *Candida albicans* ATCC 10231, *Malassezia furfur* IMTSP. 225, *Nocardia brasiliensis* IMTSP. 739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizados como controles positivos nos ensaios enzimáticos. Para todos os ensaios enzimáticos as amostras foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud por 14 dias a 25°C.

2.2 Ensaios qualitativos

Ensaios qualitativos foram utilizados para determinar as atividades gelatinase, urease e amilase.

Ensaio de atividade gelatinase: As amostras foram cultivadas em tubos contendo 5 mL do meio teste de acordo com o método relatado por Rij 1984, e Kutzman & Fell 1998. As amostras foram consideradas negativas quando o meio permaneceu sólido. Elas foram consideradas positivas quando a gelatina se liquefez e houve crescimento fúngico. *Nocardia brasiliensis* IMTSP 739 foi utilizada como controle positivo.

Ensaio de atividade urease: A atividade urease foi determinada de acordo com o método proposto por Rij 1984 e Kutzman & Fell 1998. As amostras foram cultivadas por 7 dias a 25°C. As amostras foram consideradas negativas quando o meio de cultura não mudou de cor e positivas quando o meio de cultura tornou-se rosado. *Nocardia brasiliensis* IMTSP 739 foi utilizada como controle positivo.

Ensaio de atividade amilase: A atividade amilase foi determinada de acordo com o método descrito por Minami et al., 2003. As amostras foram cultivadas por 14 dias a 36,5 °C e lugol foi adicionado sobre a superfície do ágar. As amostras foram consideradas positivas quando halos

claros ou rosados formaram-se em torno das colônias. *Nocardia brasiliensis* IMTSP 739 foi utilizada como controle positivo.

2.3 Ensaio semi-quantitativos

Ensaio semiquantitativos foram realizados para determinar as atividades fosfolipase, lipase e DNase.

Fragmento de micélio de cada amostra foram triturados em almofariz e o material celular foi suspenso em 1 mL de água destilada estéril. A suspensão foi adicionada a placas de petri contendo meio específico para cada enzima testada. Após o crescimento completo do fungo sobre a superfície do ágar (7 a 14 dias), discos de 5 mm de cultura foram recolhidos e aplicados, em triplicata em outras placas de petri contendo o meio específico. As placas foram incubadas por 10 dias a 30 °C. As atividades lipase e fosfolipase foram caracterizadas por halos opacos de precipitado de sabão de cálcio em torno das colônias e a atividade DNase por halos de precipitação em torno dos pontos de inoculação. A atividade enzimática das amostras (Pz) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (cd) e o diâmetro da colônia mais o halo de precipitação (cdp). Foram consideradas negativas as amostras com $Pz = 1$, amostras fracamente positivas $Pz \geq 0,64 > 1$, e amostras fortemente positivas $Pz < 0,64$. As leituras de crescimento fúngico e de halos foram realizadas a 2, 4, 6, 8 e 10 dias.

Ensaio de atividade lipase: A atividade lipase foi determinada de acordo com o método utilizado por MUHSIN et al., 1997. *Malassezia furfur* IMTSP. 225 foi utilizada como controle positivo.

Ensaio de atividade fosfolipase: A atividade fosfolipase foi determinada de acordo com o método descrito por PRICE et al., 1992; *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

Ensaio de atividade DNase: A atividade DNase foi determinada de acordo com o método proposto por Lopez-Martinez et al., 1994; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo.

3 RESULTADOS

Todos os agentes de cromoblastomicose mostraram uma reação positiva para as atividades urease e gelatinase e negativa para a atividade amilase quando comparadas com a amostra controle de *N. brasiliensis*. A atividade DNase não foi observada nas amostras avaliadas. O crescimento fúngico foi lento e quase imperceptível quando comparado ao controle positivo *S. aureus* ATCC 25923, cujo Pz = 0.290 no 10º dia de cultivo.

Em relação à atividade fosfolipase, as amostras podem ser classificadas em três grupos (Figura 1). O primeiro que foi caracterizado por alta atividade fosfolipase incluiu *F. pedrosoi* MA e IMTSP. 674 além do controle positivo *C. albicans* ATCC 25923; o segundo grupo foi composto por *F. pedrosoi* ATCC 46422, ATCC 46428 e IMTSP. 49, com atividade fosfolipase mais baixa e o terceiro grupo consistiu de outros agentes e foi caracterizado pela ausência de atividade fosfolipase embora algum crescimento fúngico foi observado.

Somente cinco amostras (*F. pedrosoi* ATCC 46422, ATCC 46428, IMTSP. 49, IMTSP 674 e MA) apresentaram halos de precipitação detectáveis. As amostras de *F. pedrosoi* 674 e MA já apresentaram atividade fosfolipase na primeira leitura sendo *F. pedrosoi* MA sendo que apresentou atividade melhor que o controle positivo após 8º dia. Estas amostras demonstraram atividade fosfolipase e crescimento micelial constantes. As amostras de *F. pedrosoi* 46128, 46422 e 49 apresentaram halos de precipitação a partir do 6º dia de cultura. A amostra de *F. pedrosoi* também apresentou forte atividade lipase no 10º dia Pz=0.625. Por outro lado, o valor

de Pz de *F. pedrosoi* MA foi 0,623 no 4º dia de cultivo e o de *F. pedrosoi* 674 foi 0,593 no 8º dia.

A análise estatística para fosfolipase, realizada através do teste “t” para observações independentes, apresentou diferença estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, para as amostras *Fonsecaea pedrosoi* 674, aos 10 dias de cultivo, *Fonsecaea pedrosoi* MA aos 6, 8 e 10 dias de cultivo e para a cepa padrão *Candida albicans* também aos 6, 8 e 10 dias de cultivo. Para as demais amostras estudadas, nos diferentes tempos de cultivo, não houve diferença estatisticamente significativa. Os valores de atividade enzimática obtidos aos 4, 6, 8 e 10 dias de cultivo, foram comparados individualmente com a não produção da enzima testada, ou seja, Pz=1.

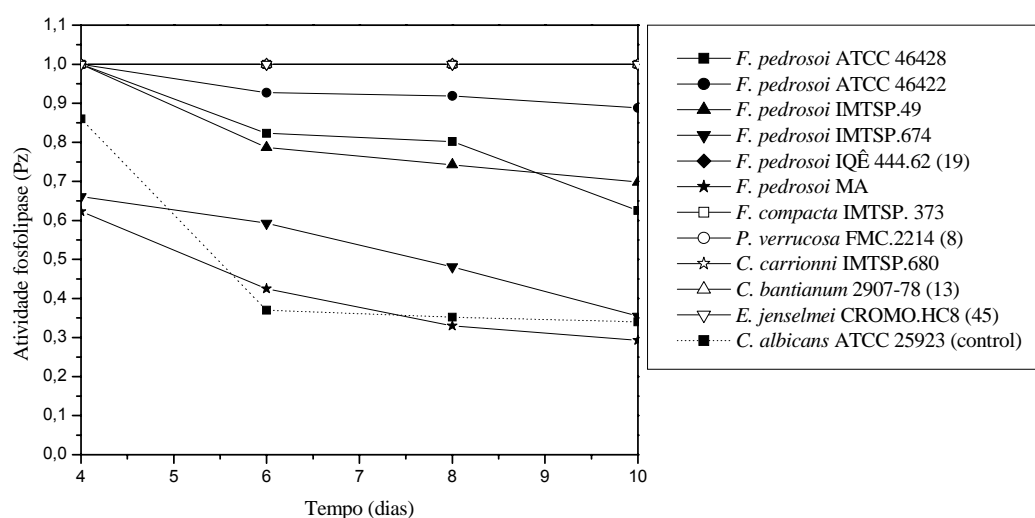


Figura 1 - Perfil de atividade fosfolipase (Pz) de agentes de cromoblastomicose cultivados em ágar específico. As linhas pontilhadas representam o comportamento de *C. albicans* (controle positivo).

Todas as amostras mostraram elevada atividade lipase e os valores de Pz aumentaram com o tempo de cultivo, indicando que os halos das colônias aumentaram menos que os halos de precipitação de sabão de cálcio (Figura 2) sob condições nutricionais limitadas. Após o sexto dia de cultivo somente *F. pedrosoi* MA, IMTSP. 674, ATCC 46422 e *C. bantianum* 13 foram melhores produtores de lipase que o controle positivo *M. furfur* IMTSP. 225.

F. pedrosoi IMTSP.674 a amostra com o maior halo de precipitação, obtido no décimo dia de cultivo. O valor de Pz variou pouco entre as amostras desta espécie ($Pz = 0,287 \pm 0,066$), indicando homogeneidade deste grupo embora as amostras foram isoladas de diferentes locais.

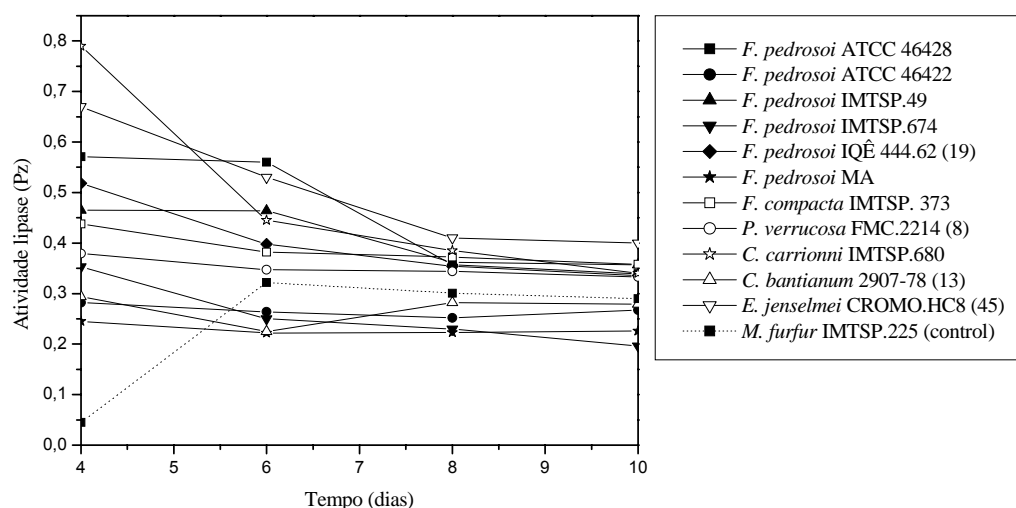


Figure 2 – Perfil de atividade lipase (Pz) de agentes de cromoblastomicose cultivados em ágar específico. As linhas pontilhadas representam o comportamento de *C. albicans* (controle positivo).

A figura 3 mostra a reação de precipitação produzida pela amostra de *F. pedrosoi* MA e também uma amostra com reação negativa.



Figure 3 – Placa com halos de precipitação característicos de produção de lipase na presença de Tween 80 por *F. pedrosoi* MA (à esquerda) e por *F. pedrosoi* 46422 (à direita) em estágio inicial de crescimento, sem halos em torno das colônias.

As amostras de *F. pedrosoi* 46422 and MA apresentaram a maior atividade lipase na primeira leitura (4^o dia). Por outro lado estes valores não mostraram variações relevantes no 10^o dia, indicando que o substrato foi facilmente metabolizado pelas amostras, apesar do seu crescimento lento, o que reforça a idéia de que Tween 80, usado como fonte de carbono, não acumula biomassa eficientemente mas estimula a excreção de lipase pelo fungo.

Para a atividade lipase foi utilizada a mesma análise estatística do que para o teste de fosfolipase, sendo que, somente as amostras *Fonsecaea pedrosoi* 46428 aos 4 e 6 dias de cultivo, e as amostras *Fonsecaea pedrosoi* 19, *Cladosporium carrionni* 680, e *Exophiala jenselmei* 45, não apresentaram diferença estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%.

4 DISCUSSÃO

As atividades DNase, urease, gelatinase e amilase não foram úteis na diferenciação das amostras analisadas por que foram todas positivas (urease e gelatinase) ou negativas (DNase e amilase). A atividade DNase foi associada com virulência em dermatófitos, permitindo a discriminação entre amostras oriundas de casos crônicos e agudos de dermatofitose (Lopez-Martinez et al., 1994). A ausência desta atividade nos agentes de cromoblastomicose analisados indica que esta atividade enzimática não é importante na explicação de interações fungo-hospedeiro.

As atividades gelatinase e urease não foram quantificadas neste estudo mas apresentaram potencial para diferenciar agentes de cromoblastomicose desde que seu uso para este propósito já tem sido descrito, particularmente para a caracterização de *Cladosporium carrionii* e *Exophiala jeanselmei* (Fischer & Cook, 2001). Investigações posteriores nestas propriedades podem ser conduzidas em futuros estudos.

Fosfolipase é utilizada como um marcador de virulência de alguns fungos patogênicos tais como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Microsporium canis* (Price, Wilkinson & Gentry, 1982; Williamson, Samaranayake & Macfarlane, 1986; Ibrahim et al., 1995; Chen et al., 1997; Maia, 1997; Kothavade & Panthaki, 1998; Vidotto et al., 1998; Ghannoum, 2000; Cox et al., 2001; Birch, Denning & Robson, 2004). Entre estas espécies fúngicas, isolados clínicos apresentaram maior atividade fosfolipase que isolados ambientais mostrando um fator de biotipagem para a diferenciação de linhagens com maior virulência (Ibrahim et al., 1995; Chen et al., 1997; Kothavade & Panthaki, 1998; Birch, Denning & Robson, 2004). Embora a expressão da atividade fosfolipase é uma característica de informação genética disponível, a sua estimulação como resposta à adaptação ao hospedeiro humano não pode ser excluída, o que poderia explicar a maior atividade enzimática em isolados clínicos.

Em nosso estudo, embora as amostras foram caracterizadas como isolados clínicos somente as amostras de *F. pedrosoi* apresentaram atividade fosfolipase, indicando um possível marcador para diferenciação deste gênero de outros gêneros de fungos negros associados com cromblastomicose. Também pode haver uma possível relação com a patogênese da cromblastomicose porque a amostra de *F. pedrosoi* MA, uma das melhores produtoras de fosfolipase, foi isolada de um paciente do Maranhão com lesões altamente crônicas e refratárias e resistente à terapia antifúngica convencional.

Os resultados negativos das outras amostras (*Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantianum*, *Exophiala jeanselmei*) não excluem a possibilidade de que a produção de fosfolipase possa estar restrita ao ambiente intracelular o que já tem sido descrito para outros fungos patogênicos (Das & Banerjee, 1977).

A atividade lipase apresentada pelos agentes de cromblastomicose aqui investigados mostra que esta atividade enzimática esteve presente em todas as amostras estudadas, porém em diferentes níveis. A assimilação rápida de Tween 80 associada à elevada atividade enzimática sem acúmulo de biomassa, particularmente com as amostras de *F. pedrosoi* MA, IMTSP. 674 e ATCC 46422 e *C. bantianum* 2907-78 (13), reforça a hipótese de que este comportamento está possivelmente relacionado à patogenicidade e virulência destes agentes semelhante a estudos que relatam uma taxa elevada de dermatite seborréica à produção de lipase em diferentes substratos e sob efeito do pH para *Mallassezia furfur* (Plotkin, et al., 1996), ou de virulência de amostras de *Candida albicans* (Schaller et al, 2005).

Similarmente ao que foi observado para fosfolipase, maior atividade lipase foi também verificada em isolados de infecções micóticas crônicas (Lopez-Martinez et al., 1994). Além disso, a amostra *F. pedrosoi* MA apresentou novamente elevada atividade lipase reforçando a relação entre o potencial hidrolítico de triglicerídeos e fosfoésteres em agentes de cromblastomicose e virulência e patogenicidade.

A atividade lipase observada em agentes de cromoblastomicose pode ser de grande valor para a caracterização enzimática de outros fungos patogênicos. Esta característica sugere fácil penetração destes agentes na pele do hospedeiro, contribuindo para a virulência dos isolados. Também a maior frequência de atividade lipase elevada em amostras de *F. pedrosoi* e *Cladophialophora bantianum* em relação a outras amostras reforça a possibilidade de uso deste marcador bioquímico para a diferenciar estas amostras dos gêneros *Phialophora*, *Cladosporium* e *Exophiala*. Entretanto, posterior investigação é necessária para confirmar estes achados, com inclusão de maior número de amostras de mesma espécie bem como de outros gêneros tais como *Wangiella* e *Rhinochadiella*. O uso de atividade lipase para diferenciar gêneros fúngicos intimamente relacionados a infecções micóticas é bem relatado na literatura especialmente com relação a dermatófitos (Nobre & Viegas, 1972).

Finalmente, a presença de atividades lipase e fosfolipase as quais estão relacionadas à virulência e patogenicidade de algumas infecções causadas por fungos saprofitos (Zeppenfeldt, Richard Yegres and Yegres, 1994), sugere um possível mecanismo adicional de adaptação de agentes de cromoblastomicose a ambientes agressivos tais como a matriz extracelular do tecido subcutâneo no hospedeiro humano conforme já observado para a melanina.

5 CONCLUSÕES

A determinação de atividades lipase e fosfolipase em agentes de cromoblastomicose tem um grande potencial para diferenciação destes agentes. Estes fungos têm a produção de lipase como característica comum, mas a intensidade da produção depende de cada isolado. A atividade fosfolipase parece ser uma característica bioquímica ligada ao gênero *Fonsecaea* e pode ser indicada para diferenciar este gênero de outros gêneros de agentes de

cromoblastomicose. As atividades urease e gelatinase são uma característica de agentes de cromoblastomicose assim como a atividade lipase e sua utilidade como marcadores para diferenciar gêneros de agentes desta patologia necessita ser posteriormente investigada. DNase e amilase não são uma característica de agentes de cromoblastomicose e podem ser usadas para diferenciar este grupo de fungos de outros fungos negros.

6 REFERÊNCIAS

ATTILI, D.S., DE HOOG G.S., PIZZIRANI-KLEINER A.A. RDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *Med Mycol.* 1998, 36, 219-225

BARROS, T.F., RESENDE M.A. Partial characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1999, 41, 343-350.

BELL A.A., WHEELER M.H. Biosynthesis and functions of melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* v. 24, p.411-451, 1986.

BIRCH, M., DENNING, D.W., ROBSON, G.D. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med. Mycol.* 2004, 42, 81-86.

BRAHIM, A.S., MIRBORD F., FILLER S.G., BANNO Y., COLE G.T., KITAJIMA Y., EDWARDS J.E., NOZAWA Y., GHANNOUM M.A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun,* 1995, 63, 1993-1998.

CALIGIORNE, R. B., RESENDE, M.A.; OLIVEIRA, R.C.B.W., VALÉRIO, H.M., CORDEIRO, R.A., AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1999, ano 2 vol. 11, 22 - 25.

CHEN, S.C.A., MULLER M., ZHOU J.Z., WRIGHT L.C., SORRELL T.C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J. Infec. Dis.* 1997, 175, 414.

COX, G.M., McDADE H.C., CHEN S.C.A., TUCKER S.C., GOTTFREDSSON M., WRIGHT L.C., SORRELL T.C., LEIDICH S.D., CASADEVALL A., GHANNOUM M.A. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 2001, 39, 166-175.

DAS. S.K.; BANERJEE A.B. Lipolytic enzymes of *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 1977, 15, 313-323.

DE HOOG, G.S., QUEIROZ-TELLES F., HAASE, G., FERNADEZ-ZEPPEFELDT, G., ANGELIS D.A., VAN DEN ENDE A.H.G.G., MATOS T., PELTROCHE-LLACSAHUANGA H., PIZZIRANI-KLEINER A.A., RICHARD-YEGRES N., VICENTE V., YEGRES F. Black Fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*, 2000, 38, Suppl I, 243-250.

ESPINELL-INGROFF, A., SHADOMY S., DIXON D., GOLDSON P. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi*, and *Phialophora verrucosa*. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 23, 305-310.

FISCHER, F., COOK N.B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Trad: FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda. 2001, 337p.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbial. Rev.*, 2000, 13, 122-43.

IWATSU, T., MIYAJI M., TAGUCHI H., OKAMOTO S. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* and *Exophiala jeanselmei*. *Mycopathologia*, 1982, 77, 59-64.

KOTHAVADE, R.J., PANTHAKI M.H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. *J. Med. Microbiol.*, 1998, 47, 99-102.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam, 1055 p., 1998

LACAZ C.S., PORTO E., MARTINS J.E.C. *Micologia médica: Fungos actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998, 445p.

LOPEZ-MARTINEZ, R., MANZANO G.P., MIER T., MENDEZ T.L.J., HERNÁNDEZ H.F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 1994, 36, 17-20.

MAIA, M.L.S. Caracterização de biótipos de *Microsporium canis* isolados de animais. São Paulo, 1997. 123p. (Dissertação: Mestrado em Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, universidade de São Paulo).

MARTÍNI, J.P., COSTA H.C., SOUZA, L.C.D. Crescimento rápido da cromomicose (*Fonsecaea pedrosoi*) utilizando eucalipto (*Eucalyptus sp*) como meio de cultivo. *Salusvita*. 1986, 5, 72-82.

MCGINNIS, MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1983, 8, 1-16.

MINANI, P. S.; Micologia Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. 1rd ed., Manole, 199 p., 2003.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C.D.; MALLMANN, L.F.; EDELWEISS, M.I.; SCROFERNEKER, M.L. Cromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, 44, 585-592.

MUHSIN, T.M., AUBAID A.H., AL-DUBOON A.H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycosis*, 1997, 40, 465-469.

NOBRE, G., VIEGAS, M. M.P. Lipolytic activity of dermatophytes. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1972, 46, 319-323.

PLOTKIN, L.I., SQUIQUERA, L., MATHOV, I., GALIMBERT, R., LEONI J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*., 1996, 34, 43-48.

PRICE, M.F., WILKINSON I.D., GENTRY L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 1992, 20, 7-14.

RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F., ZEPPENFELDT G. Chromomycosis; endemia rural, laboral y familiar en Venezuela. *Rev. Iberoam. Micol.* 1992, 9, 38-41.

RIJ, N. J. W K.-V. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, 1081 p, 1984.

SCHALLER, M.,BORELLI C., KORTING H.C., HUBE B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005, 48, 365-377.

SIDRIM J.J.C., MOREIRA J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara-Koogan, 1999, 287p.

SILVA, J.P; SOUZA, W, ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*, 1999, 143, 171-175.

TAYLOR B.E., WHEELER M.H. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. *Mycologia* v.79, p.320-322, 1987.

VIDOTTO, V., LEONE R., SINICCO A., ITO-KUWA S., CRISEO G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Micopathologia*, 1998, 142, 71-76.

WILLIANSO, M.I., SAMARANAYAKE L.P., MACFARLANE T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. *J. Vet. Med. Mycol.*, 1986, 24, 415-417.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE DE AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS. PARTE I:
CULTIVO EM MEIO SÓLIDO**

***Juliana Mônica da Costa¹; Valeriano Antonio Corbellin^{2,1}; Marco Flores Ferrão²; Maria
Lúcia Scroferneker^{3,1}***

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Química e Física da Universidade de Santa Cruz do Sul; Rio Grande do Sul, Brasil

³Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

A impressão digital metabólica obtida por Espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS) de 9 amostras de 6 espécies de agentes de cromoblastomicose (*Fonsecaea pedrosoi* (4), *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora bantianum*, *Cladosporium carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* and *Exophiala jeanselmei*), cultivados em meio sólido foi analisada por Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) e correlacionado com a atividade lipase (quantificado por ensaio com pNPP), pelo método de regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Utilizando estes métodos foi possível discriminar seis gêneros e espécies, pela utilização da região espectral 1230-1650 e 2800 +3000 cm^{-1} para amostras cultivadas por 14 dias. A atividade de lipase foi predita para agentes da cromoblastomicose, utilizando modelos em PLS com as regiões espectrais de 1230-1650 e 2800-300 cm^{-1} e 900-1450 cm^{-1} para amostras com 21 dias de cultivo. A análise em separado das amostras de *F. pedrosoi* gerou um modelo de predição para biomassa de 21 dias com RMSEV = 0,058 e rVal = 0,970 com 8 variáveis latentes utilizando a regiões espectrais (1100-1300) + (1330-1460) + (1550-1650) cm^{-1} . O melhor modelo obtido com o agrupamento de espécies de *P. verrucosa*, *C. bantianum*, *C. carrionii*, *R. aquaspersa* and *E. jeanselmei* foi gerado pelas mesmas regiões espectrais porém com RMSEV= 0,138 e rVal = 0,884 e 8 variáveis latentes. Os resultados permitiram concluir que é possível aplicar a espectroscopia de infravermelho para discriminação de fungos dematiáceos e para quantificação da atividade lipase extracelular ligada à biomassa destes agentes.

Palavras-chave: Agentes da cromoblastomicose; lipase; espectroscopia no infravermelho, quimiometria, DRIFTS, HCA

1. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) tem sido utilizada como uma ferramenta robusta para diferenciar, classificar e identificar microrganismos, principalmente nos últimos trinta anos com o desenvolvimento de técnicas baseadas na interferometria de espectroscopia de infravermelho de amostras líquidas (reflectância total atenuada - ATR) e sólidas (reflectância difusa - DRIFTS) de células microbianas intactas combinadas com microscopia, programas estatísticos de análise multivariada e novos sistemas computacionais para aquisição de dados (Naumann, 2000; Mariey et al, 2001, Maquelin et al., 2002).

A maior parte dos estudos tem sido realizados com bactérias e leveduras, mais raramente com fungos filamentosos, e pesquisas para encontrar correlação entre a impressão digital metabólica (obtida por análise espectral do conteúdo celular) com critérios taxonômicos tais como carácter Gram+/-, gênero e espécie intimamente relacionados por métodos de genotipagem, aspectos fisiológicos de crescimento microbiano (requerimento nutricional) e suscetibilidade antimicrobiana. Para estes casos as ferramentas quimiométricas (Brereton, 2003) de classificação como Análise por Grupamento Hierárquico (HCA) modelagem independente de analogia de classes (SIMCA), Método do Vizinho mais próximo (KNN) e Análise por Componentes Principais, tem sido amplamente utilizadas. (Oust et al., 1991; van der Mei, Naumann & Busscher, 1993; Goodacre et al., 1996; Haag et al, 1996; Kümmerle, Scherer & Seiler, 1998; Mohaček-Grošev, Božac & Puppels, 2001; Ngo-Thi, Kirschener & Naumann, 2003; Essendoubi et al., 2005; Fischer et al., 2006; Louginbüh, Jimeno & Zehntner, 2006; Rubio, et al., 2006)

Por outro lado FT-IR em conjunto com métodos de análise uni ou multivariada tais como redes neurais artificiais (ANN), regressão por mínimos quadrados parciais tem sido aplicados

quando o objetivo é realizar triagem de amostras biológicas para alta produção de metabólitos intracelulares microbianos (Helm & Naumann, 1995; Winson, 1997) ou ensaios de atividade enzimática. (Pacheco et al, 2003). Todavia a utilização da impressão digital metabólica espectral da célula microbiana, para predizer quantitativamente algumas propriedades bioquímicas como a atividade enzimática específica com base em métodos quimiométricos é ainda pouco explorada.

A atividade de lipase é uma atividade enzimática de grande interesse em microbiologia. Na microbiologia industrial as lipases (glicerol ester hidrolases, E.C.3.1.1.3) encontram aplicação em detergentes, couro, papel, farmácia, indústrias de química fina, tratamento de efluentes e particularmente em indústrias de óleos e gorduras. (Gandhi, 1997; Sharma, Chisti & Banerjee, 2001; Teles, Cabral & Santos, 2001; Reetz, 2002; Castro et al, 2004). Em microbiologia médica, as lipases tem sido estudadas em alguns fungos e bactérias devido a sua correlação com virulência e patogenicidade em infecções humanas. (Plotkin, et al., 1996; Schaller et al, 2005).

Lipase é normalmente quantificada através da liberação de ácidos graxos ou glicerol de triacilglicerol ou ésteres de ácidos graxos (Gupta et al, 2003). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise mediada por lipases podem ser quantificados utilizando-se ensaios titrimétricos, espectrofotométricos, fluorimétricos, cromatográficos ou imunológicos.

Um ensaio espectrométrico baseado em IR para quantificação de atividade lipase foi desenvolvido por Walde e Luisi (1989). Neste método, o pico máximo de ésteres de ácidos graxos e de ácidos graxos livres (1751 e 1715 cm^{-1} , respectivamente) no espectro FT-IR da mistura reacional bruta foram quantificados com base nos respectivos coeficientes de absorção molar e na Lei de Beer.

A cromoblastomicose é uma infecção crônica usualmente limitada a pele e a tecidos subcutâneos, cujos agentes etiológicos são fungos dematiáceos caracterizados como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea compacta*, *Wangiella dermatitidis* e *Exophiala jeanselmei*. A patogênese das infecções está relacionada com componentes celulares, alguns dos quais com potencial imunogênico. (Silva e Fazioli, 1985; Silva e Ekizlerian, 1985; Ibrahim-Granet, de Bièvre & Jendoubi, 1988; Farbiarz et al. 1992) e virulência (Limongi et al, 1997) tais como a persistência *in situ* do fungo em tecidos subcutâneos e a excreção de enzimas degradativas excretadas por células da resposta inflamatória reações celulares granulomatosas. (Esterre et al. 1993).

Recentemente nós investigamos a dependência da atividade de lipase em relação ao tempo de alguns agentes da cromoblastomicose, verificando-se que este grupo de fungos negros apresenta potencial lipolítico variável quando cultivado em ágar sólido com Tween 80 como fonte de carbono. Considerando uma possível relação entre atividade lipase com virulência e patogenicidade nestes fungos, nós pensamos que seria possível encontrar alguma informação na impressão digital metabólica espectral da biomassa obtida por FT-IR que explicasse a grande variabilidade da atividade lipase produzida por estes patógenos. Neste contexto, nós aplicamos a Espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier e a Quimiometria para a classificação de 9 amostras de agentes da cromoblastomicose de acordo com o seu potencial lipolítico e a previsão da sua atividade enzimática utilizando método PLS. Nosso principal objetivo foi propor uma nova, rápida, não destrutiva e eficiente abordagem quantitativa da atividade lipase pela utilização de análise multivariada de frequências do infravermelho de fungos negros relacionados taxonomicamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Armazenagem e cultivo das amostras

Amostras de agentes da cromoblastomicose foram obtidas no Laboratório de Fungos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e cultivadas em ágar Sabouraud inclinado à 25 °C. As amostras foram constituídas por: *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, ATCC 46422, IMTSP 49, IMTSP 674, IQE 444.62 (19), MA; *F. compacta* IMTSP. 373; *Phialophora verrucosa* FMC.2214 (8); *Cladosporium carrionii* IMTSP. 680; *Cladophialophora bantianum* 2907-78 (13); *Exophiala jeanselmei* CROMO.HC8 (45). *Rhinoctadiella aquaspersa* CROMO.HC1 (691).

Agar lipase (g L⁻¹) : bacteriological petona 10, Tween 80 10, cloreto de cálcio 0,1, cloreto de sódio 5, ágar 20, água destilada q.s.p.1L.

Para cada amostra, seis placas contendo ágar lipase foram cobertas com 1 mL de suspensão de material celular de biomassa fúngica (previamente cultivada por 14 dias em caldo Sabouraud), incubadas por 14 e 21 dias a 30 °C e desidratadas em estufa a 35° C por aproximadamente 48 h sendo, após, armazenadas em triplicata a 4 °C.

2.2 Ensaio para lipase

Uma alíquota de 250 mg de ágar com micélio desidratados foram suspensos em 10 mL de solução tampão de fosfato de potássio 0,05 mol L⁻¹. O material foi incubado a 37 °C em incubador orbital por 2 h a 250-300 rpm para extração da lipase. Após, as amostras foram filtradas e os extratos foram utilizados para análise via método do palmitato de p-nitrofenila, pNPP (Palomo et al., 2004).

Em um tubo de ensaio foram colocados 0,25 mL da solução A (pNPP 4×10^{-4} mol L⁻¹, dissolvido em 2-propanol), 2,25 mL da solução B (0,207 g de deoxicolato de sódio e 0,1 g de goma arábica, dissolvidos em 90 mL de tampão fosfato de potássio 0,025 mol L⁻¹, pH 7) e 0,5 mL da amostra. O material foi incubado por 5 min a 37 °C e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 348 nm e comparado com a absorção de uma curva padrão de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0.10⁻⁴ mol L⁻¹.

2.3 Registro dos espectros

Espectros no infravermelho-médio foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Magna 550 (Nicolet) acoplado com um dispositivo para reflectância difusa com feixe de luz monocromático em amostras sólidas previamente misturadas com brometo de potássio. Cada espectro FT-IR foi coletado em duplicata na região entre 400 e 4000 cm⁻¹ com 32 varreduras.

2.4 Processamento dos dados

Os espectros foram lidos em triplicata em absorbância para cada amostra, normalizados e processados por autoescalamento com correção de espalhamento de luz em software Pirouette 2.7 via processamento de mínimos quadrados parciais (PLS) por validação cruzada com exclusão de um componente por vez. Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliar os modelos obtidos foram, primeiramente o coeficiente de correlação de validação cruzada, rVal (o mais próximo de 1 possível) e o menor erro padrão de validação cruzada, RMSEV. Simultaneamente foi avaliada a variância relativa acumulada, VRA, para se ter noção da informação necessária para alcançar os modelos otimizados em função do número de fatores utilizados.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade lipase em função do tempo

A Tabela 1 traz os resultados referentes á dosagem da atividade enzimática de lipase utilizando-se o método colorimétrico do palmitato de p-nitrofenila.

Tabela 1 - Resultados da dosagem de lipase com palmitato de *p*-nitrofenila de agentes de cromoblastomicose cultivados em meio sólido.

Amostra	Ensaio Enzimático ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	
	14 dias	21 dias
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	0,307 \pm 0,012	0,777 \pm 0,04
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	0,446 \pm 0,03	0,225 \pm 0,012
<i>F. pedrosoi</i> IMTSP.49	0,503 \pm 0,019	0,514 \pm 0,010
<i>F. pedrosoi</i> IQÊ 444.62 (19)	0,473 \pm 0,017	0,300 \pm 0,08
<i>P. verrucosa</i> FMC.2214 (8)	0,433 \pm 0,013	0,336 \pm 0,014
<i>C. carrionni</i> IMTSP. 680	0,456 \pm 0,09	0,748 \pm 0,033
<i>C. bantianum</i> 2907-78 (13)	0,129 \pm 0,018	0,370 \pm 0,031
<i>R.aquaspersa</i> CROMO.HC1 (691)	0,607 \pm 0,03	0,205 \pm 0,011
<i>E. jeanselmei</i> CROMO.HC8 (45)	0,683 \pm 0,012	0,191 \pm 0,04

Os resultados demonstram uma variabilidade grande entre as amostras analisadas após 14 dias de cultivo, onde mesmo entre as do mesmo gênero e espécie, *F. pedrosoi*, houve diferenças relevantes, como entre a ATCC 46428 e a IMTSP.49. Quando comparadas aos outros gêneros e espécies, verificou-se que a amostra *C. bantianum* foi a que apresentou a

menor atividade enzimática, 0,129 IU, enquanto que a amostra *E. jeanselmei* apresentou 0,683 IU, a maior atividade de lipase aos 14 dias de cultivo. Com 21 dias algumas amostras apresentaram redução de atividade tais como *F. pedrosoi* ATCC 46422 e *E. jeanselmei* CROMOHC8 (45), enquanto que outras aumentaram (*F. pedrosoi* ATCC 46428, *C. carrionii* IMTSP.680 e *C. bantianum* 2907-78 (13).

Os resultados da dosagem de lipase realizados com palmitato de p-nitrofenol aos 14 e 21 dias de cultivo, foram analisados estatisticamente através do “teste t” para observações independentes. O objetivo foi verificar se existia diferença estatisticamente significativa entre as dosagens obtidas em tempos de cultivo diferentes, para o nível de confiança de 95%. Com exceção da amostra *Fonsecaea pedrosoi* 49, todas as demais apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as duas dosagens. Estes resultados confirmam que o palmitato de p-nitrofenol é um método confiável para dosagem de lipase.

3.2 Análise da atividade lipase por espectrometria de infravermelho e quimiometria

A metodologia empregando métodos quimiométricos baseou-se na seleção de frequências de espectros realizados com DRIFTS obtidos a partir de biomassa de agentes da cromoblastomicose cultivados em placa durante 14 e 21 dias. A seleção das frequências seguiu um critério baseado nas regiões características de bandas de absorção de biomoléculas que costumam ser detectadas majoritariamente partindo-se da utilização do espectro total (Naumann, 2000).

Um aspecto essencial da análise por DRIFTS foi determinar as regiões ou janelas espectrais que permitiriam diferenciar as várias espécies baseadas nos seus espectros. Uma análise preliminar na forma de inspeção visual possibilitou a identificação de zonas com capacidade discriminatória e também aquelas para as quais uma boa reprodutibilidade dos

espectros entre as replicatas de uma mesma amostra pudesse ser observada. Após esta inspeção foram feitos vários estudos de otimização de maneira a agrupar as duplicatas de uma mesma leitura espectral bem como as triplicatas referentes a três incubações simultâneas da mesma amostra. Após várias seleções de regiões espectrais conseguiu-se chegar a um dendograma de HCA otimizado construído a partir da análise das regiões de (1230-1650) + (2800 +3000) cm^{-1} (Figura 1).

Próximo ao nível de similaridade de 0,8 o dendograma apresenta a formação de 11 grupos distintos. O primeiro formado pelas amostras de *R. aquaspersa*, o segundo por 4 amostras de *F. pedrosoi* ATCC 46428, o terceiro por amostras de *P. verrucosa*, o quarto por amostras de *C. carrionii*, o quinto por amostras de *F. pedrosoi* 49, o sexto por amostras de *F. pedrosoi* ATCC 46428 e ATCC 46422, o sétimo e o oitavo grupos formados por amostras de *F. pedrosoi* 49, o nono por amostras de *E. jeanselmei* e o décimo e décimo primeiro por amostras de *C. bantianum*.

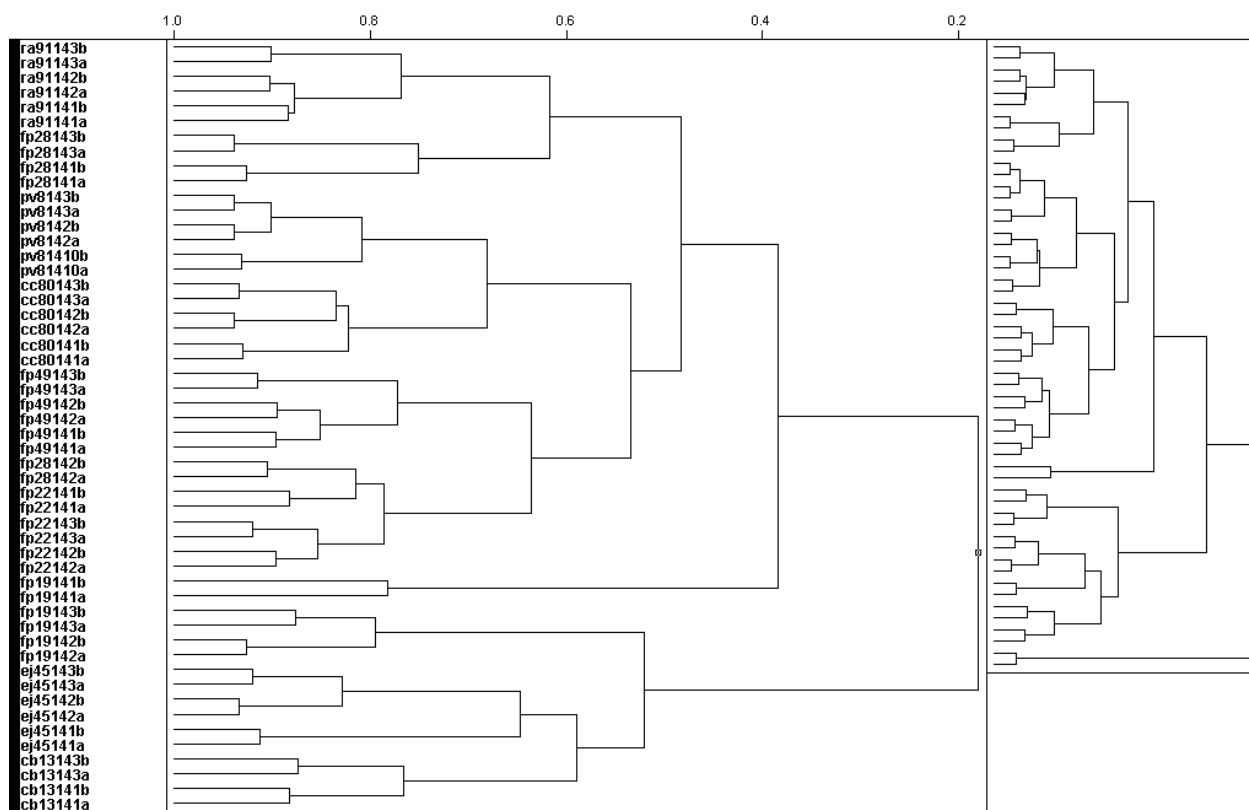


Figura 1 - Dendrograma representando a análise por agrupamento hierárquico de 9 agentes de cromoblastomicose (6 gêneros) utilizando os dados autoescalados, normalizados e tratados com MSC e o método de construção incremental correspondente a região espectral de $(1230-1650) + (2800 + 3000) \text{ cm}^{-1}$, obtidas de 3 culturas independentes em ágar lipase.

É interessante observar que, as amostras de *F. pedrosoi* apesar de pertencerem a um mesmo gênero apresentam diferenças espectrais que as separam em grupos que não se originam de um mesmo ramo do dendrograma. Ainda dentro de um mesmo conjunto de replicatas foram detectadas diferenças que inviabilizaram o agrupamento das mesmas como no caso *F. pedrosoi* ATCC 46428, ATCC 46428, 19 e *C. bantianum*.

Após várias tentativas de aplicar a análise por agrupamento hierárquico para o conjunto de espectros referentes ao conjunto de espectros de 21 dias de cultivo não foi possível

encontrar uma combinação de regiões que mostrassem algum grau de separação entre gêneros que permitisse aplicá-lo para classificação das amostras.

3.3 Previsão Análise da atividade lipase por espectrometria de infravermelho e quimiometria

Na figura 2 encontram-se representados os parâmetros RMSEV, rVal e VRA, para o conjunto de agentes da cromoblastomicose cultivados por 14 dias em meio sólido específico para lipase.

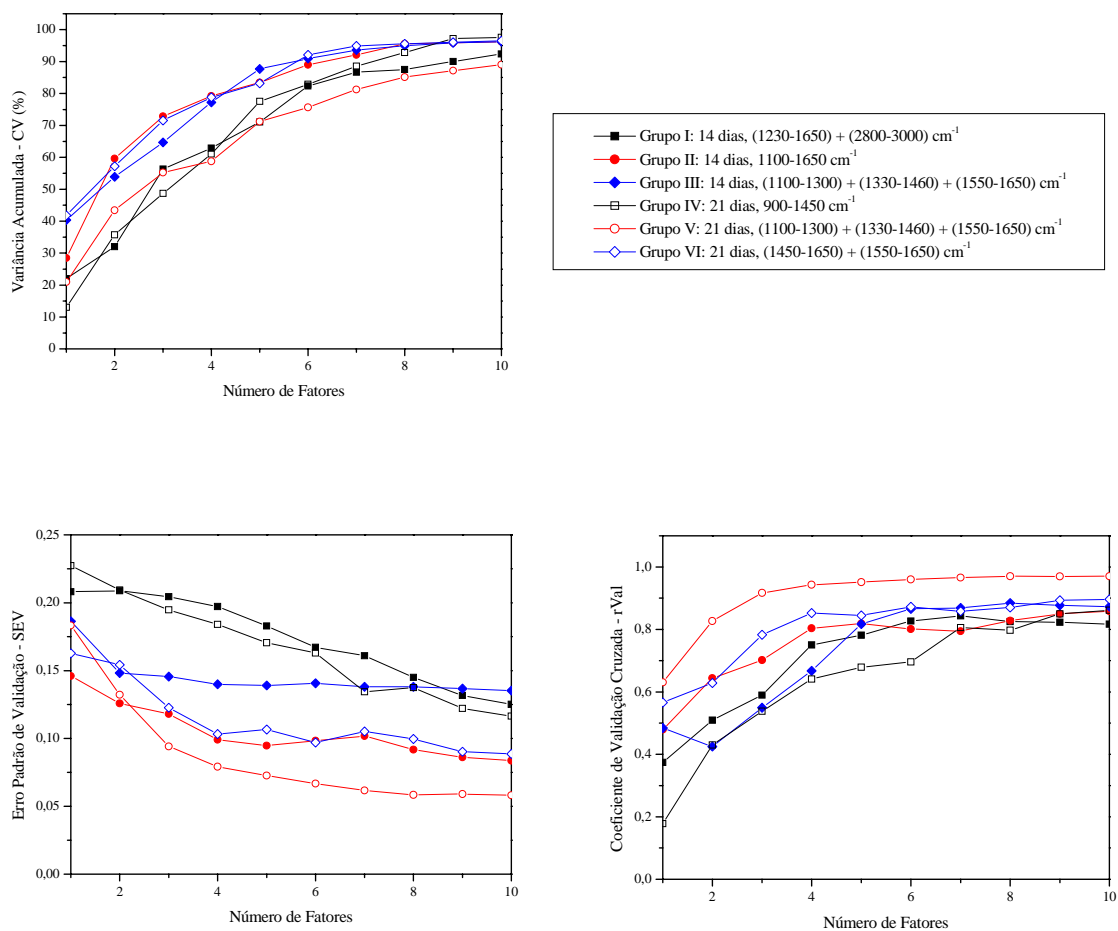


Figura 2 - Curvas de parâmetros estatísticos (VRA, RMSEV e rVal) de modelos de validação cruzada PLS-DRIFTS de biomassa de amostras de agentes de cromoblastomicose com 14 e 21 dias de cultivo em ágar lipase. Grupo I e IV: conjunto completo de amostras; Grupos II e V: amostras de *F. pedrosoi*; Grupo III e VI: amostras de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *R. aquaspersa* e *E. jeanselmei*.

Após uma seleção de variáveis foi possível encontrar um modelo otimizado PLS-DRIFTS constituído pelas regiões espectrais de (1230-1650) + (2800-3000) cm^{-1} para 14 dias e 900-1450 cm^{-1} para 21 dias (Figura 3, Tabela 2). Os parâmetros estatísticos RMSEV e rVal obtidos com estes modelos foram 0,104 e 0,843 para 14 dias e 0,117 e 0,861 para 21 dias (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros estatísticos dos modelos DRIFTS-PLS de predição da atividade lipase de agentes de cromoblastomicose cultivados em ágar por 14 e 21 dias.

Amostras	Região espectral (cm^{-1})	RMSEV	rVal	Variáveis Latentes
Grupo I 14 dias; <i>F. pedrosoi</i> e demais agentes	1230-1650 2800-3000	0,104	0,843	10
Grupo II 14 dias; <i>F. pedrosoi</i>	1100-1650	0,084	0,859	10
Grupo III 14 dias; demais agentes	1100-1650	0,138	0,884	8
Grupo IV 21 dias; <i>F. pedrosoi</i> e demais agentes	900-1450	0,117	0,861	10
Grupo V 21 dias; <i>F. pedrosoi</i>	1100-1300 1330-1460 1550-1650	0,058	0,970	8
Grupo VI 21 dias; demais agentes	1100-1460 1550-1650	0,089	0,896	10

A inclusão de maior número de variáveis latentes no modelo melhora muito pouco ou passa a perder em qualidade por inclusão de informação desnecessária. Na figura 3 é possível visualizar a relação entre os valores de atividade lipase medidos experimentalmente e os valores preditos pelo modelo PLS utilizando o conjunto completo de amostras de biomassa.

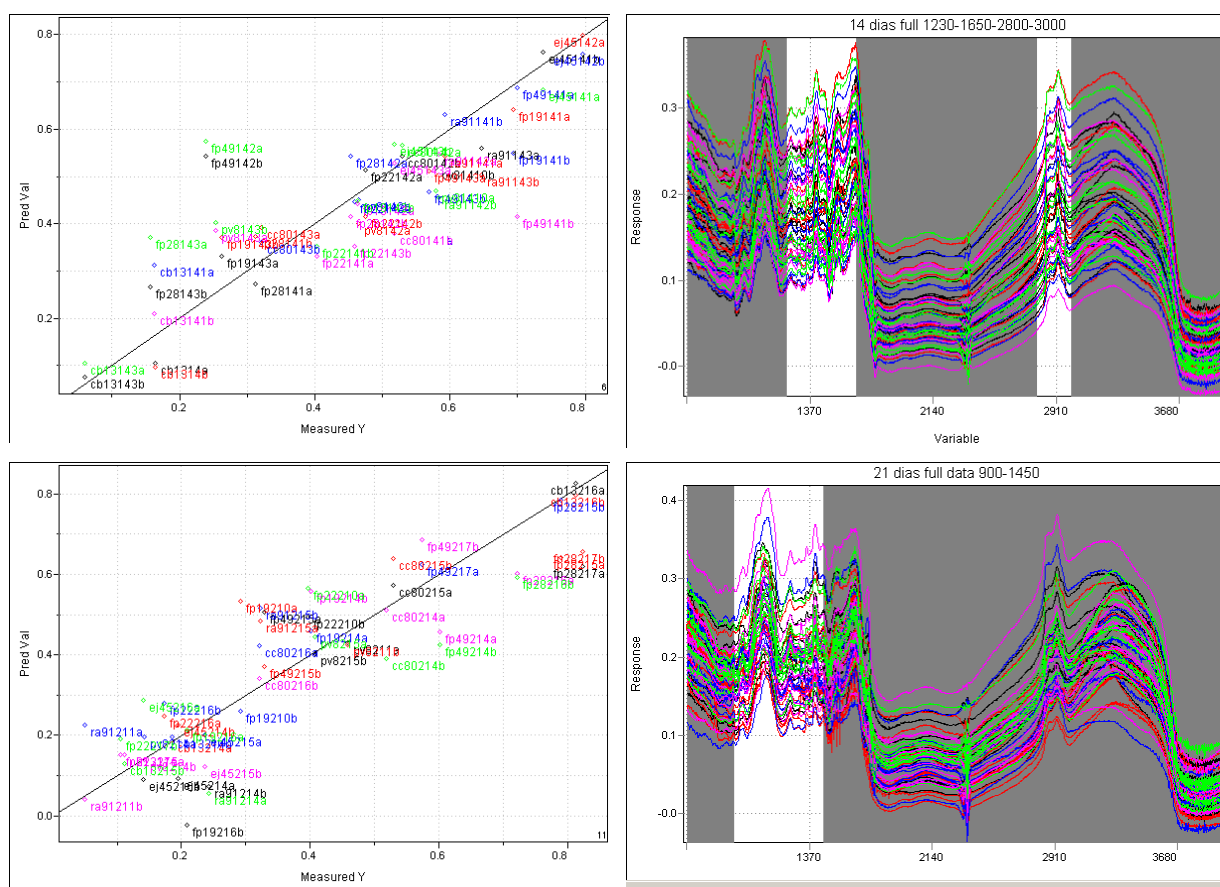


Figura 3 – Regiões espectrais selecionadas (colunas verticais em branco, figuras à direita) e respectivos modelos otimizados de validação cruzada PLS-DRIFTS (figuras à esquerda) de biomassa de 9 amostras de agentes de cromoblastomicose com 14 (parte superior) e 21 dias (parte inferior) de cultivo em ágar lipase.

Visando melhorar os parâmetros estatísticos de correlação e validação foram então estudadas as correlações do grupo de amostras de *F. pedrosoi* (Grupo II e V) e do grupo dos demais agentes (Grupo III e VI).

Os modelos obtidos com os Grupo II e III (14 dias) apresentaram melhor qualidade para predição da atividade lipase que o modelo do Grupo I (Figuras 3 e 4).

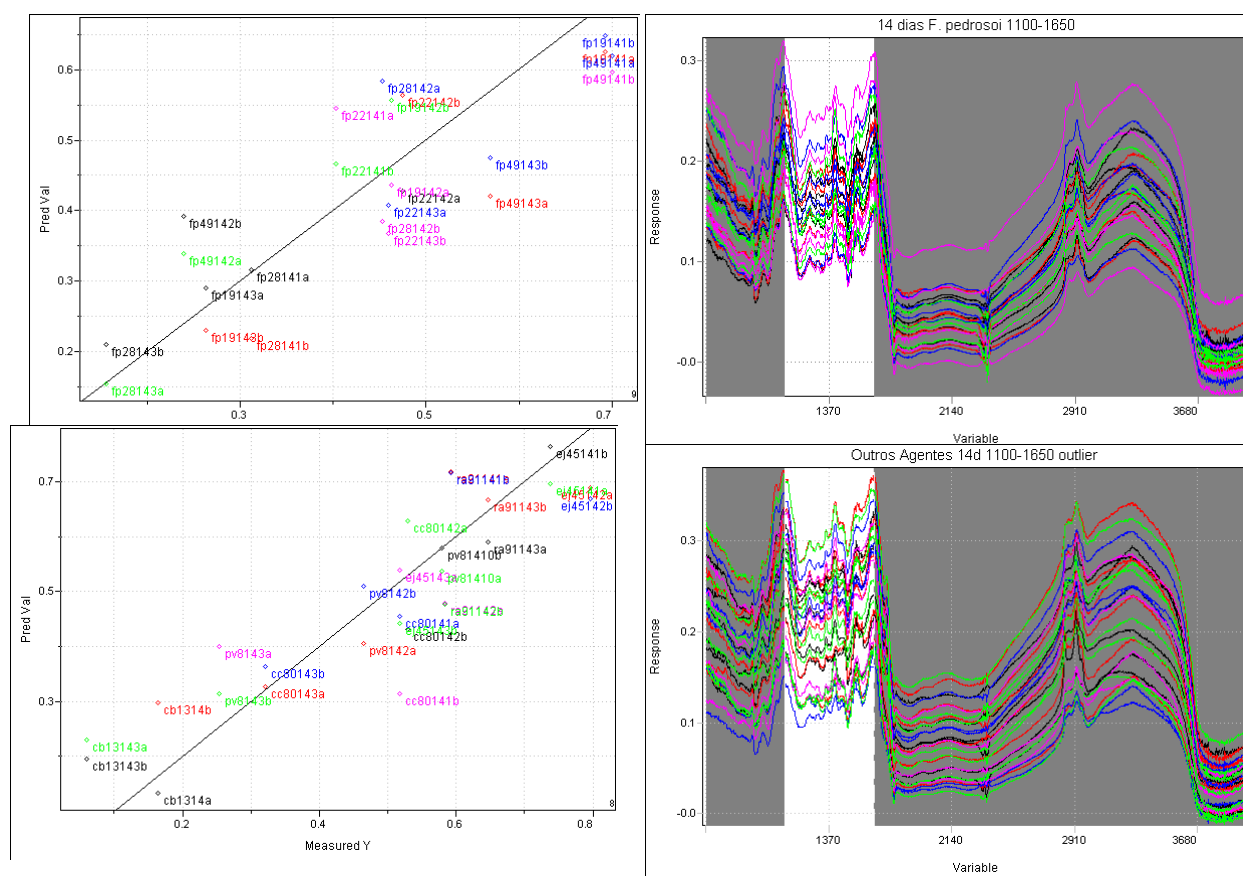


Figura 4 - Regiões espectrais selecionadas (colunas verticais em branco, figuras à direita) e respectivos modelos otimizados de validação cruzada PLS-DRIFTS (figuras à esquerda) de biomassa de amostras de *F. pedrosoi* (parte superior) e de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *R. aquaspersa* e *E. jeanselmei* (parte inferior) com 14 dias de cultivo em ágar lipase.

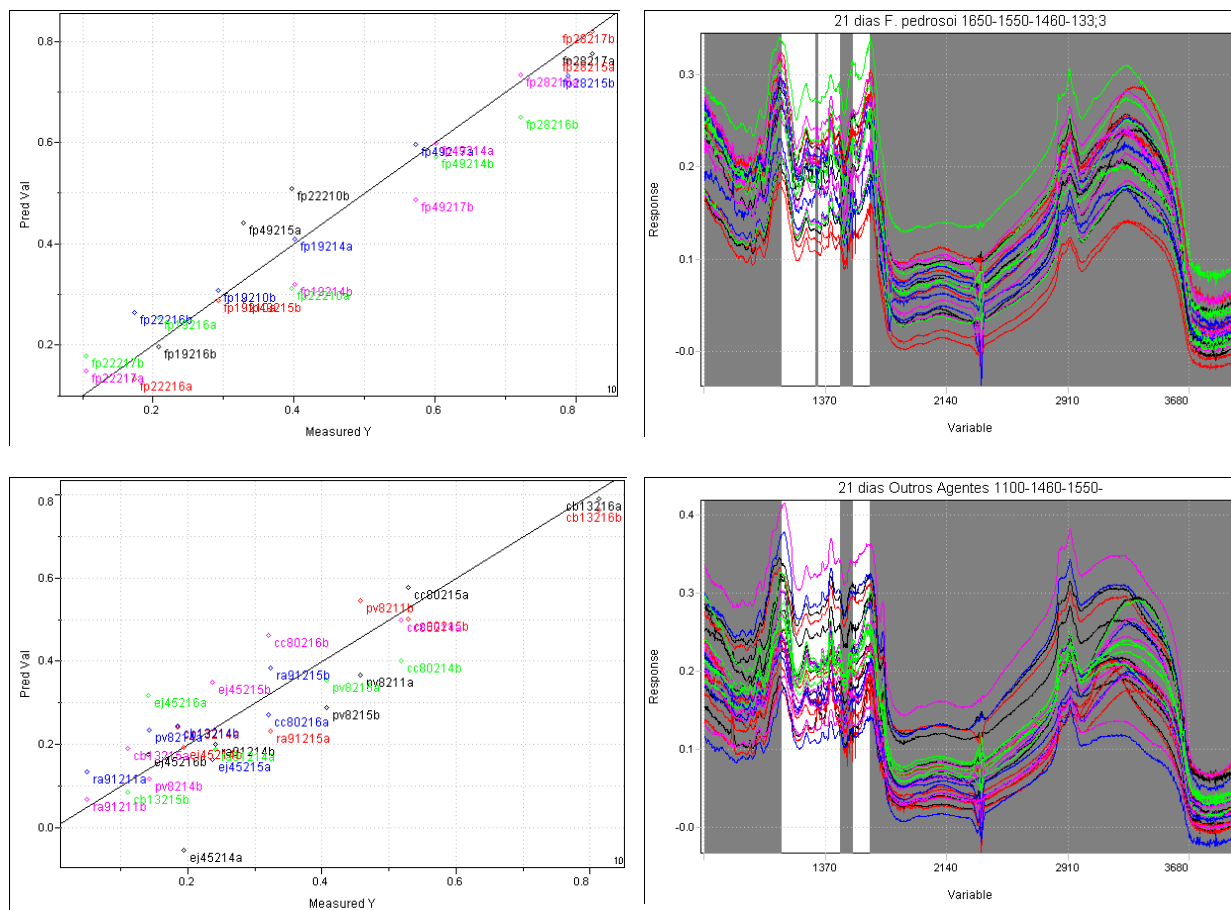


Figura 5 - Regiões espectrais selecionadas (colunas verticais em branco, figuras à direita) e respectivos modelos otimizados de validação cruzada PLS-DRIFTS (figuras à esquerda) de biomassa de amostras de *F. pedrosoi* (superior) e de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *R. aquaspersa* e *E. jeanselmei* (inferior) com 21 dias de cultivo em ágar lipase.

O Grupo II foi otimizado utilizando a região espectral de 1100-1650 cm^{-1} com RMSEV = 0,084 e rVal = 0,859 (10 variáveis latentes). O Grupo III foi otimizado com base na região de (1100-1650) com RMSEV = 0,138 e rVal = 0,884 (8 variáveis latentes). Observa-se uma alteração das regiões espectrais selecionadas para otimizar a dependência da atividade lipase

em relação aos espectros de infravermelho das respectivas biomassas de cada grupo. Nos dois grupos houve necessidade de se retirar a informação proveniente da região de 2800-3000 cm^{-1} presente no conjunto completo de amostras (Grupo I) e incluir informação proveniente de absorção de grupos C-O-C e C-O de carboidratos (900-1200 cm^{-1}).

A separação das amostras nos grupos contendo apenas *F. pedrosoi* (Grupo V) e nos demais agentes (Grupo VI) para o conjunto de amostras de 21 dias de idade levou à obtenção de modelos diferenciados em relação ao modelo do grupo IV.

A separação das amostras de *F. pedrosoi* em um grupo (Grupo V) gerou um modelo de predição com melhor qualidade que o modelo obtido com o conjunto completo de amostras (Figuras 3 e 5). Utilizando a região espectral de (1100-1300) + (1330-1460) + (1550-1650) cm^{-1} foi possível obter um modelo com parâmetros estatísticos de RMSEV = 0,058 e rVal = 0,970 com 8 variáveis latentes. Por outro lado, o grupo composto por amostras de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *E. jeanselmei* e *R. aquaspersa* (Grupo VI) originou um modelo de qualidade semelhante à do conjunto completo com RMSEV = 0,089 e rVal = 0,896 e 10 variáveis latentes, utilizando a região espectral de (1100-1460) + (1550-1650 cm^{-1}).

Novamente foi necessária uma alteração das regiões espectrais selecionadas para otimização dos modelos de predição da atividade lipase nos dois conjuntos de amostra de biomassa fracionadas em relação ao conjunto completo. Nos dois grupos (V e VI) foi necessária a retirada de informação proveniente de movimentos vibracionais de carboidratos e moléculas com ligação C-O (900-1100 cm^{-1}) e inclusão da região de absorção de bandas de amida I e II (1550-1650 cm^{-1}). Ainda no grupo V foi necessária a exclusão de parte da informação referente à banda de amida III (1240-1310 cm^{-1}).

Com o objetivo de compararmos estatisticamente os modelos que apresentaram os menores valores de RMSEV, obtidos para amostras cultivadas por 14 dias e 21 dias, aplicamos o teste F.

Quando comparados entre si os três modelos obtidos aos 14 dias de cultivo, foi possível obter diferença estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95% entre o grupo das amostras do gênero e espécie *Fonsecaea pedrosoi* e o grupo dos demais agentes da cromoblastomicose.

Para as amostras cultivadas por 21 dias, ao compararmos os três modelos obtidos, observa-se diferenças estatisticamente significativas para o nível de confiança de 95%, também entre o grupo das amostras do gênero e espécie *Fonsecaea pedrosoi* e o grupo dos demais agentes da cromoblastomicose, e o grupo contendo todas as amostras quando comparado ao grupo das amostras do gênero e espécie *Fonsecaea pedrosoi*.

Ao comparar-se os mesmos grupos, porém cultivados em tempos diferentes, 14 dias e 21 dias, foi possível observar que o grupo em que estão todas as amostras e no grupo das *Fonsecaea pedrosoi* não houve diferença estatisticamente significativa, ao nível de confiança de 95%, em função do tempo de cultivo, enquanto que no grupo em que estavam os demais agentes da cromoblastomicose estudados, quando comparados apresentaram diferença estatisticamente significativa.

4 DISCUSSÃO

A detecção de atividade lipase tem encontrado aplicação na diferenciação e caracterização de fungos patogênicos. Alguns estudos têm demonstrado haver envolvimento desta atividade enzimática e na virulência ou mesmo patogênese de infecções fúngicas (Plotkin, et al., 1996; Schaller et al, 2005). Em agentes de cromoblastomicose esta atividade vem sendo recentemente explorada visando esta correlação. As amostras aqui avaliadas apresentaram níveis variados de atividade lipase mesmo entre amostras do mesmo gênero. Este

comportamento também variou com a idade do cultivo indicando diferentes habilidades na assimilação do substrato Tween 80.

Normalmente trioleína, tributirina e derivados do ácido oléico são utilizados como indutores de atividade lipase em meios de cultura (Sharma, Chisti & Banerjee, 2001). Tween 80 se mostrou uma fonte adequada para indução de atividade lipase em agentes de cromblastomicose. Sua escolha para este estudo foi devido ao próprio protocolo do meio para triagem de atividade lipase (Ionita et al, 1997; Gupta et al., 2003) e a sua prévia utilização em alguns estudos de produção de lipases microbianas (Li, Cheng & Chen, 2004).

A eficiência do cultivo em ágar lipase para classificação e discriminação entre gêneros de família *Herpotrichiellaceae* por impressão digital metabólica espectral no infravermelho foi dependente da idade do cultivo. Culturas de 14 dias em ágar lipase originaram um modelo de classificação via análise por agrupamento hierárquico que permitiu a diferenciação de todas as espécies investigadas com resultados tão bons quanto os de outros estudos de classificação (Huber-Haag et al., 1996; Essendoubi et al. 2005). Entretanto com culturas de 21 dias não foi possível chegar a um modelo satisfatório.

A utilização de FT-IR para classificação de fungos ainda é pouco descrita. Em agentes de cromblastomicose é o primeiro estudo na área. Entretanto, novos meios de cultivo utilizados em rotina laboratorial deverão ser investigados para verificar a amplitude da utilização de FT-IR e métodos quimiométricos de classificação para esta classe de agentes. Agentes de cromblastomicose são normalmente caracterizados e diferenciados por ensaios laboratoriais de investigação morfofisiológica demorados (Fischer & Cook, 2001). A proposição de um modelo de classificação do tipo HCA-DRIFTS permite agilizar este tipo de análise, pois uma vez criado um modelo robusto que aceite grande variabilidade amostral e com elevado valor discriminatório este pode ser usado para identificação de novas amostras conforme já proposto

para outros grupos de microrganismos patogênicos (Naumann, 2000; Mariey et al, 2001, Maquelin et al., 2002).

A região selecionada para o modelo HCA utilizado, (1230-1650) + (2800-3000) cm^{-1} , indica que contribuições de movimentos vibracionais associados a ésteres de fosfato (P=O, 1220-1250 cm^{-1}), bandas de amidas (N-H, 1240-1310 e 1550-1650 cm^{-1}), ácidos carboxílicos livres (COO^{-1} , $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$), tirosinas (1515 cm^{-1}) e cadeias orgânicas com elevado número de ligações C-H na sua composição (C-H, 2800-3000 cm^{-1}) (Naumann, 2000) contribuem para a classificação de amostras de *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *E. jeanselmei* e *R. aquaspersa*. A necessidade de incluir a região de 2800-3000 cm^{-1} para o correto agrupamento e diferenciação de *R. aquaspersa* em relação às demais amostras mostra a presença de componentes endógenos como ácidos graxos como marcadores espectrais desta espécie.

Os resultados aqui apresentados relatam também, pela primeira vez, a aplicação de regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para correlacionar a impressão digital metabólica espectral de biomassa fúngica com a atividade lipase ligada ao micélio e extracelular. Métodos analíticos multivariados utilizando FT-IR já tem sido relatados em outras situações semelhantes onde é necessário quantificar o acúmulo de um metabólito intra ou extracelular (Vanini et al., 1996; Murhammer et al., 1997; Winson et al, 1997; Suci, Vrani & Mittelman, 1998; Suehara, Nakano & Yano, 1998; Vaidyanathan et al. 2000; Vaidyanathan, Harvey, McNeil, 2001). Entretanto esta aplicação não se estende à determinação da atividade lipase em biomassa fúngica. A análise aqui proposta de correlação entre espectros de DRIFT de agentes de cromoblastomicose e atividade lipase (ligada ao micélio e extracelular) é uma primeira investigação nesta área e baseia-se em um método multivariado de predição quantitativa de uma propriedade bioquímica.

A presença de diferentes regiões espectrais nos modelos otimizados de quantificação de atividade lipase mostra a complexidade da dependência de uma atividade enzimática em relação a um substrato escolhido para quantificá-la. Num primeiro momento poderia se pensar que a relação de dependência deveria se restringir à região de $1650-1550\text{ cm}^{-1}$ referente à concentração de proteínas. Isto seria melhor aceito se a atividade lipase fosse determinada pela quantificação do teor de proteína específica para as diferentes amostras analisadas (Gupta et al., 2003).

Entretanto, a atividade lipase ligada ao micélio ou extracelular, quando quantificada por reconhecimento de um substrato específico como aqui, depende de uma seqüência de fatores intra e extracelulares. Fatores intracelulares vão desde a sua sinalização interna para ativação da expressão gênica após reconhecimento do substrato, passando pela síntese protéica, ativação molecular, repressão catabólica e terminado por sua migração através do citoplasma, membrana citoplasmática, e parede celular até sua excreção. Fatores extracelulares caracterizam-se pelas condições do método analítico utilizado para sua quantificação (temperatura, pH, concentração e a especificidade do substrato, resposta linear do método) (Reetz & Jaeger, 1998).

Alguns eventos intracelulares são dependentes da ação de fosfatases ou de metabólitos fosforilados. Recentemente tem sido detectada atividade fosfatase na parede celular de conídios, micélio e corpos esclerócitos de *F. pedrosoi* (Kneipp et al, 2003) o que poderia explicar a relação entre atividade celular e frequências de absorção de compostos fosforilados nestes agentes.

Agentes de cromoblastomicose depositam na parede celular e em estruturas citoplasmáticas um pigmento negro complexo constituído por unidades de 1,8-dihidroxi-naftaleno associado a resíduos de açúcares, aminoácidos e lipídios (Bell & Wheeler,

1986, Taylor & Wheeler, 1987; Alviano et al, 1991; Franzen, 1999). A contribuição de frequências referentes à melaninas pode ter relação com alguns fatores:

a) relação com a sinalização, migração e excreção de lipases. A maior deposição de melanina poderia comprometer estas funções diminuindo os níveis de lipase produzidas e, conseqüentemente, as suas atividades.

b) O acúmulo de melaninas estaria relacionado com a sua biossíntese. A biossíntese de melanina DHN deve-se à ativação da rota dos policetídeos alimentada pela elevação dos níveis endógenos de acetilCoA durante catabolismo do ácido oléico liberado pela a hidrólise do Tween 80 como resposta aos níveis de lipase extracelular ou ligada ao micélio (Bell & Wheeler, 1986, Taylor & Wheeler, 1987). O acúmulo de melanina depende do particionamento entre o consumo de acetilCoA para alimentar o metabolismo primário e o metabolismo secundário. Estas são características fisiológicas dependentes do genótipo de cada espécie estudada. Quanto menor for a necessidade de acetilCoA para atender as exigências do metabolismo primário mais sobra para a biossíntese de melanina ou de seus precursores. Logo, entre cepas com mesmo grau de ativação do metabolismo primário, o maior acúmulo de melanina pode estar relacionado indiretamente com a maior atividade lipase.

Os métodos de quantificação de atividade lipase são normalmente associados à determinação de ácidos graxos liberados por hidrólise de triglicerídeos ou substratos contendo ligação éster entre um ácido graxo e um álcool ou fenol (Gupta et al., 2003). Neste contexto, são utilizadas as técnicas que envolvem titrimetria, espectrofotometria no uv-visível e fluorimetria. A determinação direta dos níveis de lipase produzida é realizada por métodos de determinação específica de proteínas como os imunológicos. O desenvolvimento de um método analítico multivariado de quantificação de atividade lipase baseado na composição da biomassa fúngica interpreta associa os dois fatores: o acúmulo de ácidos graxos liberados por hidrólise o acúmulo de proteína responsável por esta hidrólise. A proposição de um modelo

desta natureza facilita a rotina de triagem de novas lipases e o acompanhamento de fermentações em fase sólida.

Os modelos aqui obtidos refletem que é possível obter um bom modelo de previsão de atividade lipase com base na biomassa microbiana que lhe deu origem. Como pode ser visto, a qualidade deste modelo é dependente de diversos fatores tais como, seleção de amostras e de variáveis, idade do cultivo.

A seleção de frequência foi um fator importante para a qualidade dos modelos de previsão propostos tanto para o conjunto completo de amostras como para os grupos II (somente amostras de *F. pedrosoi*) e III (associação de amostras de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *E. jeanselmei* e *R. aquaspersa*). Esta operação é necessária porque parte da informação espectral é irrelevante ou não se correlaciona com a propriedade em questão como as regiões abaixo de 900 cm^{-1} e acima de 3000 cm^{-1} .

A diminuição do número de amostras e o seu reagrupamento também podem levar à necessidade de seleção de frequências. Este comportamento foi observado com os modelos de 14 e 21 dias de cultivo.

A idade do cultivo parece ser um fator importante para a previsão da atividade lipase com base na impressão digital metabólica da biomassa por FT-IR, pois os modelos otimizados obtidos apresentam regiões espectrais diferenciadas. Com 14 dias o modelo é mais complexo necessitando de informações acumuladas nas regiões de $1230\text{-}1650$ e $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. Estas amostras devem estar com uma maior quantidade de biomoléculas acumuladas no interior das células em resposta à assimilação de nutrientes do meio de cultura devido à atividade lipase. A região de $1230\text{-}1650$ contribui com absorção de proteínas, aminoácidos e ésteres de fosfato. A região de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ informa haver relação entre a atividade lipase detectada e o acúmulo de compostos com elevada contribuição de grupos CH, CH₂ e CH₃ aromáticos e alifáticos presentes em diversas biomoléculas (Naumann, 2000, Silverstein, 1997). A julgar pela elevada

concentração de Tween 80 no meio de cultura e pela fase ativa de assimilação deste substrato pode se dizer que esta região contribui com absorção de ácidos graxos e precursores de melanina. Esta região teve de ser incluída para agrupamento e classificação adequada das amostras de *R. aquaspersa* em relação às demais amostras.

Culturas de 21 dias perdem esta informação por escassez de nutrientes do meio de cultura e consumo de nutrientes endógeno restando apenas material de reserva de assimilação mais lenta. As amostras tornam-se mais homogêneas do ponto de vista bioquímico. Esta alteração na composição leva a diferentes efeitos na qualidade dos modelos de predição da atividade lipase em função da impressão digital metabólica. Quando se utiliza o conjunto completo de amostras fúngicas (Grupo IV) ou as amostras de *F. pedrosoi* (Grupo V) observa-se um aumento no valor de $rVal$ e uma diminuição no valor de RMSEV em relação aos grupos I e II, porém compromete a qualidade do modelo de predição para o Grupo VI em relação ao grupo III.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foram propostos um método de classificação e um método de avaliação do potencial lipolítico de fungos dematiáceos utilizando a impressão digital metabólica obtida por Espectroscopia de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier associada a métodos de análise multivariada, HCA e PLS.

A utilização do método HCA possibilita a correta discriminação de amostras de agentes de cromblastomicose pertencentes às espécies *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *E. jeanselmei* e *R. aquaspersa*. A eficiência do método é dependente da região espectral das impressões digitais metabólicas utilizadas e da idade do cultivo sendo adequada a sua aplicação para amostras de biomassa com tempo de cultivo de 14 dias quando cultivadas

em meio de cultura contendo basicamente peptona e Tween 80 como fontes carbono e nitrogênio.

É possível estimar quantitativamente a atividade lipase associada ao micélio ou liberada no meio de cultura para agentes de cromoblastomicose constituídos por espécies *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *E. jeanselmei* e *R. aquaspersa* usando espectroscopia de infravermelho e regressão por PLS. O método é dependente da homogeneidade taxonômica do grupo de amostras de biomassa utilizada e da idade do cultivo, tornando-se mais eficiente quando amostras de *F. pedrosoi* são estudadas separadamente.

Num sentido mais amplo, este trabalho apresenta uma nova metodologia de avaliação do potencial enzimático de microrganismos associando métodos de caracterização enzimática clássicos (cultura em ágar) com técnicas espectroscópicas e métodos de análise multivariada e vem se somar a outros métodos já existentes.

6 REFERÊNCIAS

ALVIANO CS., FARBIARZ SR., DE SOUZA W., ANGLUSTER, J., TRAVASSOS, L.R. Characterization of *Fonsecea pedrosoi* melanin. *J. Gen. Microbiol.* 1991, 137, 837-844.

BELL A.A., WHEELER M.H. Biosynthesis and functions of melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1986, 24, 411-451.

BRERETON, R.G. CHEMOMETRICS: data analysis for the laboratory and chemical plant. Chichester. John Wiley & Sons Ltd, 2003, 489p.

CASTRO, H.F., MENDES A.A., SANTOS J.C., AGUIAR C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*, 2004, 27, 146-156.

ESSEDOUBI, M., TOUBAS D., BOUZZAGOU M., PINON J-M., MANFAIT M., SOCKALINGUN G.D. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1724, 239-247.

FARBIARZ, S.R., DE CARVALHO T.U., ALVIANO C., DE SOUZA W. INHIBITORY Effect of melanin on the interaction of *Fonsecea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992, 30, 265-273.

FISCHER, F., COOK N.B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Trad: FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2001, 337p.

FISCHER, G., BRAUN S., THISSEN R., DOTT W. FT-IR Spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J. Microbiol. Method.* 2006, 64, 63-77.

FRANZEN A.J., DE SOUZA, W., FARINA, M., ALVIANO, C.S., ROZENTAL, S. morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecea pedrosoi*. *FEMS Microbiol Letters*, 1999, 173, 395-402.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1997, 74, 621-634.

GOODACRE, R., TIMMINS E.M., ROONEY P.J., ROWLAND J.J., KELL D.B. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial networks. *FEMS Microbiol Lett.*, 1996, 140, 233-239.

GUPTA, R., RATHI P., GUPTA N., BRADDOO S. Lipases assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, 37, 63-71.

HAAG, H., GREMLICH, H-U, BERGMANN R., SANGLIER, J.-J. Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. *J. Microbiol. Method.* 1996, 27, 157-163.

HELM, N., NAUMANN D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 126, 75-79.

IBRAHIM-GRANET, Q., DE BIÈVRE C., JENDOUBI, M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *Fonsecea pedrosoi* by species-specific IgG. *J. Med. Microbiol.*, 1988, 26, 217-222.

IONITA, A., MOSCOVICI, M., POPA, C., VAMANU, A., POPA, O., DINO, L. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential, and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *J. Mol. Cat. B. Enzym.* 1997, 3, 147-151.

KÜMMERLE, M., SCHERER S., SEILER H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 2207-2214.

LI, C.-Y., CHENG, C.-Y., CHEN, T.-L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens*, using Tween 80 as the carbon source. *Biochem. Eng. J.*, 2004, 19, 25-31.

LIMONGI, C.L. ROZENTAL S., ALVIANO C.S., DE SOUZA W. The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecea pedrosoi* with Chinese Hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia*, 1997, 138, 127-135.

LOUGINBÜHL, W., JIMENO J., ZEHNTNER, U. Identification of seven species of the *Lactobacillus acidophilus* group by FT-IR spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39, 152-158.

MAQUELIN, K., KIRSCHNER C., CHOO-SMITH, L.-P., VAN DEN BRAAK N., ENDTZ H.PH. NAUMANN D., PUPPLES G.J. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Method.*, 2002, 51, 255-271.

MARIEY, L., SIGNOLLE J.P., AMIEL C., TRAVERT J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*. 2001, 26, 151-159.

MELIN, A.-M., ALLERY A., PERROMAT A., BÉBÉAR C., DÉLÉRIS G., BARBEYRAC, B. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool for characterization of mollicutes. *J. Microbiol. Method.* 2004, 56, 73-82.

MOHAČEK-GROŠEV, V., BOŽAC, R., PUPPELS, G.J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochim. Acta. Parte 1: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2001, 57, 2815-2829.

MURHAMMER, D.W., RILEY, M.R., RHIEL, M., ARNOLD, M.A., WALLS, E.L., DELACRUZ, N. Simultaneous monitoring of multiple cellular metabolites in bioreactors by near-infrared spectroscopy. *Abstr, Pap. Am. Chem. Soc.* 1997, 213, 135.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 200, 102-131.

NGO-THI, N.A., KIRSCHNER C., NAUMANN D. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *J. Mol. Struc.* 2003, 661-662, 371-380.

OUST, A., MORETRO T., KIRSCHNER C., NARVHUS J.A., KOHLER A. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J. Microbiol. Method.*, 1991, 14, 127-142.

PACHECO, R., SERRALHEIRO M.L.M., KARMALI A., HARIS P.I. Measuring enzyme activity of a recombinant amidase using Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* 2003, 322, 208-214.

PLOTKIN L.I. SQUIQUERA L., MATHOV I.; GALIMBERTI R.; LEONI J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. *Med. Mycol.* , 1996, 34, 43-48.

REETZ, M.T. Lipase as practical biocatalyst. *Cur. Op. Chem. Biol.*, 2002, 30, 276-284.

REETZ, M.T., JAEGER, K.-E. Overexpression, immobilization, and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem. Phys. Lipids.*, 1998, 93, 3-14.

SCHALLER, M., BORELLI C., KORTING H.C., HUBE B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005, 48, 365-377.

SHARMA, R., CHISTI Y., BANERJEE U.C. Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 2001, 19, 627-662.

SILVA, C.L., EKIZLERIAN M. SERPUI. Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosum*. *J. Gen. Microbiol.*, 1985, 131, 187-194.

SILVA, C.L., FAZIOLI R.A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J. Med. Microbiol.*, 1985, 20, 299-305.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER G.C., MORRILL T.C. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1994, 383p.

SUCI, P.A., VRANY J.D., MITTELMAN M.W. Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials*, 1998, 19, 327-339.

SUEHARA, K., NAKANO, Y., YANO, T. Application of near infrared spectroscopy to the measurement of cell mass in solid cultures of mushrooms. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* 1998, 6, 273-277.

TAYLOR B.E., WHEELER M.H. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. *Mycologia* 1987, 79, 320-322.

TELES, F.R.R., CABRAL, J.M.S., SANTOS J.A.L. Enzymatic degreasing of a solid waste from the leather industry by lipases. *Biotechnol. Lett.*, 2001, 23, 1159-1163.

VAIDYANATHAN, S., ARNOLD, A., MATHESON, L., MOHAN, P., MACALONEY, G., MOHAN, P., MACALONEY, G., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Critical evaluation of models developed for monitoring and industrial submerged bioprocess for antibiotic production using near-infrared spectroscopy. *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16, 1098-1105.

VAIDYANATHAN, S., HARVEY, L.M., MCNEIL, B. Deconvolution of near-infrared spectral information for monitoring mycelial biomass and other key analytes in a submerged fungal bioprocess. *Anal. Chim. Acta.* 2001, 428, 41-59.

VAN DER MEI, H.C., NAUMANN D., BUSSCHER H.J. Grouping of oral streptococcal species using fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Archiv. Oral Biol.* 1993, 38, 1013-1019.

WALDE, P., LUISI P.L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1989, 28, 3353-3360.

WENDLANDT, K.-D., GEYER W., MIRSCHEL G., HEMIDI F.A.-H. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *J. Biotechnol.*, 2005, 117, 119-129.

WINSON, M.K., GOODACRE R.,TIMMINS, E.M., JONES A., ALSBERG B.K., ROWLAND J.J., KELL D.B. Diffuse reflectance absorbance spectroscopy taking in chemometrics (DRASTIC). A hyperspectral FT-IR-based approach to rapid screening for metabolite overproduction. *Anal. Chim. Acta.*, 1997, 238, 273-282.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE DE AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE, POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS. PARTE II.
CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO**

***Juliana Mônica da Costa¹; Valeriano Antonio Corbellin^{2,1} ; Marco Flores Ferrão²;
Maria Lúcia Scroferneker^{3,1}***

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

² Departamento de Química e Física da Universidade de Santa Cruz do Sul; Rio Grande do Sul, Brasil.

³Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a produção de lipase de onze agentes da cromoblastomicose pela impressão metabólica da biomassa cultivada em meio líquido específico e analisada por espectroscopia no infravermelho e análise quimiométrica. Espécies de *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora bantianum*, *Cladosporium carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Exophiala jeanselmei* quando cultivadas em caldo com Tween 80 e peptona induziram a dois picos de produção de lipase; um entre 3 e 4 dias e outro em torno de 12 dias. A análise via espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho por transformada de Fourier (DRIFTS) da biomassa de 4 e 12 dias destas culturas deu origem à modelos de predição da atividade lipase dos respectivos filtrados via processamento PLS. A qualidade dos modelos foi dependente da idade das culturas. Culturas de 4 dias originaram modelos com boa capacidade preditiva (RMSEV = 0,021, rVal=0,815) quando o inóculo utilizado se encontrou na faixa de 10^7 – 10^9 células por mL. Culturas de 12 dias apresentaram melhor capacidade preditiva com RMSEV=0,011, rVal=0,929. Através da técnica de DRIFTS foi possível acompanhar alterações metabólicas na biomassa de culturas de *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora bantianum*, *Cladosporium carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Exophiala jeanselmei* nas regiões espectrais de 650 - 1450 cm^{-1} e 1600 - 2000 cm^{-1} que se correlacionam com a atividade de lipase extracelular.

Palavras-chave: Agentes da cromoblastomicose, lipase hidrólise de triglicerídios, DRIFTS.

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose ou dermatite verrucosa é uma doença crônica da pele e tecidos subcutâneos causada por algumas espécies de fungos dematiáceos da família *Herpotrichaceae*, com vida saprofítica no solo ou em matéria orgânica dispersa na natureza (McGinnis, 1983; Richard-Yegres & Yegres, 1992). *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala jeanselmei* e *Wangiella dermatitidis* estão entre os agentes etiológicos geralmente isolados de pacientes, traumáticamente introduzidos no tecido durante exposição ocupacional.

Estudos bioquímicos e imunológicos com *Fonsecaea pedrosoi* tem mostrado que a virulência e a patogenicidade destes fungos estão relacionadas com a produção de melanina, fatores lipídicos e de adesão bem como outros componentes relacionados com a parede celular conídios e corpos escleróticos que controlam a transição morfológica de células vegetativas (saprofíticas) para células parasitárias, a persistência no tecido subcutâneo e a resposta inflamatória no hospedeiro. (Farbiarz, 1992; Rozental, Alviano & de Souza, 1994; Limongi, et al, 1997; Limongi et al., 2000; Kneipp et al, 2003).

Todos os agentes da cromoblastomicose formam colônias velutinas que crescem lentamente, com pigmentação que vai de castanho escuro ao preto-esverdeado em ágar Sabouraud. Os gêneros e as espécies destes fungos são diferenciados e identificados com base nos aspectos morfológicos de seus conidióforos e do padrão de conidiogênese, bioquímicos (Fischer e Cook, 2001), imunológicos (Iwatsu et al., 1982; Barros & Resende, 1999) e de ensaios de genotipagem (Caligorne et al, 1999, DeHoog et al, 2000). Uma atividade bioquímica ainda pouco investigada nesta classe de fungos é a atividade lipase. Alguns estudos encontraram relação entre atividade lipase e virulência em infecções micóticas o que justifica

uma investigação desta natureza com outros fungos patogênicos (Plotkin, et al., 1996; Schaller et al, 2005).

Em um estudo prévio nós relatamos a discriminação e a atividade lipase de alguns agentes da cromoblastomicose através da Técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) da impressão metabólica da biomassa cultivada em meio líquido. Diversos estudos, vem relatando a utilização de FT-IR para discriminação e identificação de microrganismos patogênicos (van der Mei, Naumann & Busscher, 1993; Goodacre et al., 1996; Naumann, 2000; Mariey et al., 2001; Essendoubi et al, 2005; Fischer et al., 2006). Também a técnica de FT-IR tem encontrado aplicação no monitoramento de processos fermentativos (Murhammer et al, 1997; Vaidyanathan, Harvey & McNeil, 2001). Em fungos filamentosos esta técnica tem sido pouco explorada (Bastert et al, 1999; Fischer et al, 2006).

Neste trabalho nós apresentamos os resultados referentes à aplicação da Técnica de Espectroscopia por Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS) e do método de regressão dos Mínimos Quadrados parciais (PLS) para predição da atividade lipase de alguns agentes da cromoblastomicose através da impressão metabólica por DRIFTS da biomassa obtida através de cultivo em meio líquido.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Armazenamento e condições de cultivo

As amostras de agentes de cromoblastomicose utilizadas neste trabalho foram obtidas do Laboratório de Fungos Patogênicos do Departamento de Microbiologia –ICBS-UFRGS, mantidas em ágar Sabouraud a 25 °C e foram assim caracterizadas: *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, ATCC 46422, ATCC 43456, IMTSP 49, IQE 444.62 (19), MA; *Phialophora*

verrucosa FMC.2214 (8); *Cladosporium carrionii* IMTSP. 680; *Cladophialophora bantianum* 2907-78 (13); *Exophiala jeanselmei* CROMO.HC8(45); *Rhinocladiella aquaspersa* CROMO.HC1 (691).

2.2 Avaliação da atividade lipase por espectroscopia de infravermelho e quimiometria em meio líquido

Uma alçada de cultura de cada amostra foi inoculada em meio líquido para produção de lipase (g L⁻¹: bacto-peptona 10; cloreto de sódio 5; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,5; extrato de levedura 10; Tween 80 10; água 1 L). Após 4 dias de cultivo estático a 30 °C, a biomassa foi triturada em gral e pistilo estéreis, filtrada e em seguida esta suspensão foi padronizada a 550 nm em 0,1 de absorbância (cerca de 10⁷ células/mL). A partir desta diluição incubou-se 0,2 mL de amostra em 20 mL (1:100) de meio líquido específico para lipase a 30 °C, desta forma a concentração final do inóculo foi de 10⁵ células/mL. As leituras foram realizadas aos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de cultivo.

Para a determinação de biomassa, as amostras foram filtradas em papel filtro Whattman nº 44, e o sobrenadante, utilizado para a determinação de lipase. A biomassa foi lavada com 5 mL de água destilada duas vezes, e após colocada em estufa a 40 °C por aproximadamente 48 h, após transferida para dessecador por mais 48 h, ou até apresentar peso constante.

Ensaio de atividade lipase: Preparou-se uma solução de Tween 80 5 % em tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Uma alíquota de 19 mL desta solução e 1 mL da amostra foram incubados em incubador orbital por 24 h a 37 °C, sob agitação de 250-300 rpm. O ensaio do controle negativo foi realizado incubando-se 19 mL da solução de Tween 80 5 % nas mesmas condições da amostra, porém adicionando-se 1 mL da amostra no momento da titulação. Amostras e controles negativos foram tituladas com NaOH 0,05 mol L⁻¹ até pH 9,5. O

volume da NaOH indica a quantidade de ácidos graxos liberados no meio em $\mu\text{mol min}^{-1}$. A reação foi parada com banho de gelo a 0 °C, e as amostras e brancos foram mantidas nestas condições até o momento da titulação.

A biomassa desidratada em estufa a 35° C por aproximadamente 48 h, foi triturada em brometo de potássio e analisada por Espectrometria de Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS) na faixa de 3800 a 600 cm^{-1} com 32 varreduras. Os espectros foram lidos em triplicata em absorbância para cada amostra, normalizados e processados por autoescalamento com correção de espalhamento de luz em software Pirouette 2.7 via processamento de mínimos quadrados parciais (PLS) por validação cruzada com exclusão de um componente por vez. Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliar os modelos obtidos foram, primeiramente o coeficiente de correlação de validação cruzada, r_{Val} (o mais próximo de 1 possível) e o menor erro padrão de validação cruzada, RMSEV. Simultaneamente foi avaliada a variância relativa acumulada, VRA, para se ter noção da informação necessária para alcançar os modelos otimizados em função do número de fatores utilizados.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade lipase em função do tempo

As curvas de produção de biomassa e de atividade lipase correspondente de agentes de cromoblastomicose encontram-se representadas na figura 1.

As curvas de produção de biomassa demonstram uma fase exponencial que varia em torno de 2 a 4 dias de início do cultivo com comportamento variado na produção de biomassa entre os agentes. As amostras que mais produzem biomassa são as de *F. pedrosoi* ATCC

46428, ATCC 46422 e 19. Por outro lado, amostras de *F. pedrosoi* 43456 e 49 são as que produzem menor quantidade de biomassa mostrando que a aptidão ao crescimento não está ligada ao gênero.

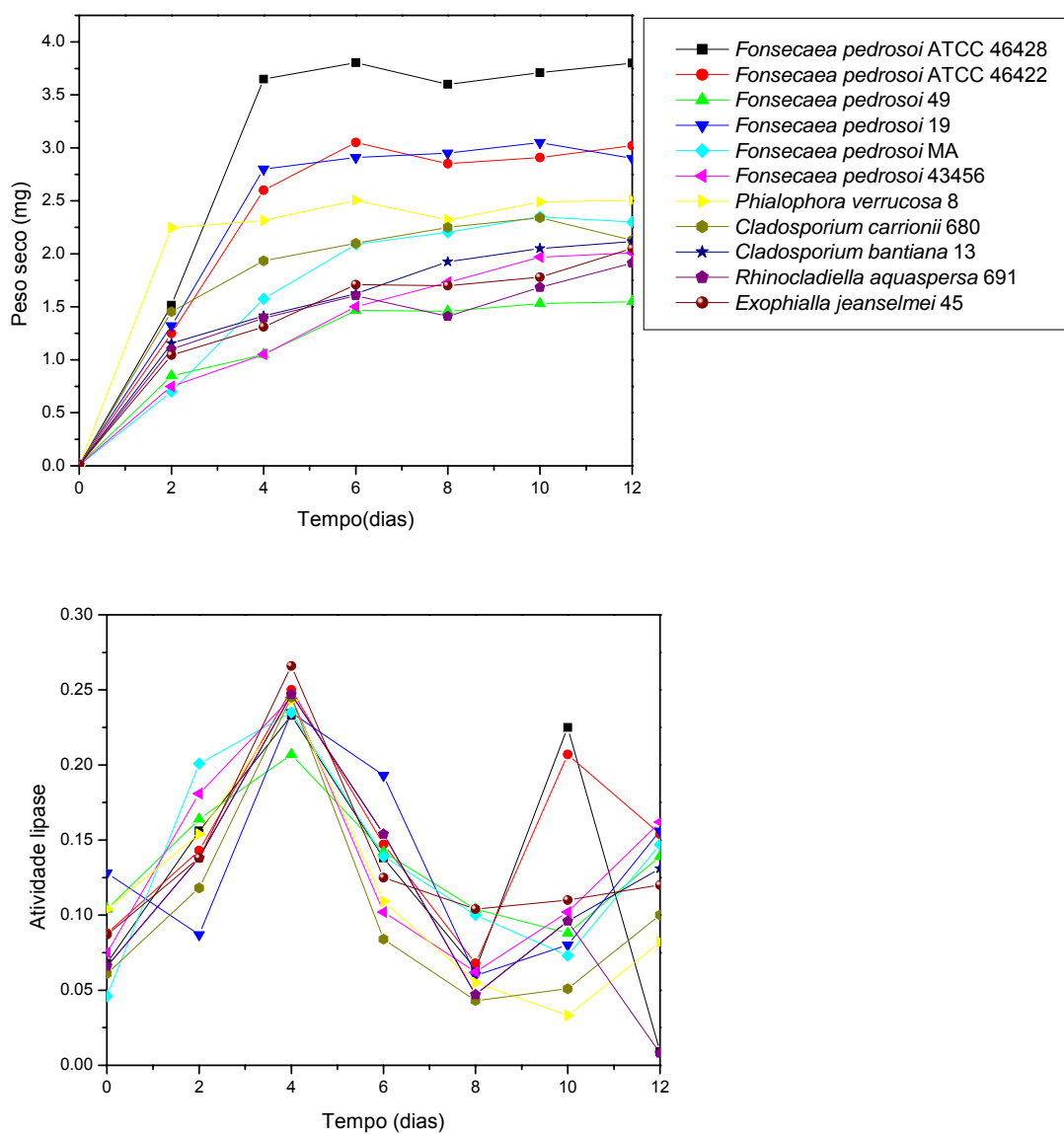


Figura 1 - Curvas de peso seco (superior) e de atividade lipase (inferior) em função do tempo de amostras de agentes de cromoblastomicose cultivados em caldo lipase.

Já as curvas de atividade lipase em função do tempo mostram um comportamento semelhante entre as amostras com um máximo em torno de 4 dias de cultivo, seguido por um decréscimo e um novo máximo que surge, na maioria das amostras a partir do 10º dia de cultivo em caldo.

Este comportamento pode estar relacionado com diferentes genes que controla a transcrição de lipases ou enzimas envolvidas na sua síntese até a apresentação na membrana sendo eles ativados por diferentes concentrações de substrato indutor (Tween 80) ou de seus metabólitos. Para fins de proposição de modelos de correlação entre atividade lipase e impressão digital metabólica seria interessante estudar a composição bioquímica da biomassa nos tempos de 4 e 12 dias de cultivo uma vez que nestas condições, rotas metabólicas de transcrição de DNA e de síntese protéica devem estar operando em maior intensidade.

3.2 Análise da atividade lipase por espectrometria de infravermelho e quimiometria

A metodologia empregando métodos quimiométricos baseou-se na seleção de frequências de espectros realizados com DRIFTS obtidos a partir de biomassa de agentes da cromoblastomicose cultivados em caldo por até 12 dias.

Na tabela 1 encontram-se os valores de dosagem de atividade lipase para as três condições de cultura utilizadas.

Tabela 1 – Valores de atividade lipase de filtrados de cultura de diferentes condições de cultivo em caldo lipase de agentes de cromoblastomicose.

Amostra	4-dias, inóculo diluído $\mu\text{mol min}^{-1}$	4 dias, inóculo concentrado $\mu\text{mol min}^{-1}$	12 dias, inóculo diluído $\mu\text{mol min}^{-1}$
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	0,135 \pm 0,010	0,131 \pm 0,008	0,158 \pm 0,020
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	0,117 \pm 0,010	0,400 \pm 0,009	0,188 \pm 0,020
<i>F. pedrosoi</i> IMTSP 49	0,122 \pm 0,040	0,147 \pm 0,020	0,146 \pm 0,007
<i>F. pedrosoi</i> IQE 444.62 (19)	0,129 \pm 0,009	0,161 \pm 0,020	0,179 \pm 0,010
<i>F. pedrosoi</i> MA	0,169 \pm 0,010	0,155 \pm 0,020	0,186 \pm 0,008
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 43456	0,130 \pm 0,040	0,146 \pm 0,010	0,206 \pm 0,010
<i>P. verrucosa</i> FMC.2214 (8)	0,185 \pm 0,030	0,169 \pm 0,050	0,122 \pm 0,017
<i>C. carrionii</i> IMTSP. 680	0,160 \pm 0,010	0,170 \pm 0,040	0,141 \pm 0,020
<i>C. bantianum</i> 2907-78 (13)	0,192 \pm 0,040	0,219 \pm 0,010	0,153 \pm 0,020
<i>E. jeanselmei</i> CROMO.HC8(45)	0,216 \pm 0,007	0,205 \pm 0,010	0,128 \pm 0,020
<i>R. aquaspersa</i> CROMO. HC1 (691)	0,141 \pm 0,050	0,180 \pm 0,030	0,147 \pm 0,010

Comparando-se as atividades lipases entre 4 e 12 dias com inóculo diluído observa-se que, com exceção das amostras de *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *C. bantianum* e *E. jeanselmei* as demais amostras apresentaram aumento da atividade lipase. Já na comparação entre diferentes concentrações de inóculo observa-se um aumento da atividade lipase para as amostras de *F. pedrosoi* ATCC 46428, IMTSP 49, IQE, 444.62 (19), ATCC 43456, *C. carrionii*, *C. bantianum* e *R. aquaspersa*. Os desvios padrões observados indicam a boa reprodutibilidade das leituras observadas.

Os resultados da dosagem de lipase realizados com Tween 80 aos 4 e 12 dias de cultivo para o inóculo diluído, ou padronizado, e aos 4 dias de cultivo para o inóculo concentrado, foram analisados estatisticamente através do “teste t” para observações independentes. O objetivo foi verificar se existia diferença estatisticamente significativa entre as dosagens obtidas em tempos de cultivo, e concentrações de inóculo diferentes, para o nível de confiança de 95%.

Quando comparados os valores de lipase para amostras com o mesmo tempo de cultivo, 4 dias, porém com concentrações de inóculo diferentes, todas apresentaram diferença estatisticamente significativa. Para as mesmas amostras, porém comparadas em tempos de cultivo diferentes, 4 e 12 dias e inóculo diluído, somente a amostra *Rhinocladiella aquaspersa* 691 não apresentou diferença estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%.

Portanto podemos concluir que a dosagem pela técnica do Tween 80 é adequada para discriminar a produção de lipase nas amostras testadas, para o nível estatisticamente significativo de 95%.

Os modelos PLS obtidos apresentaram qualidade diferenciada entre as três condições de cultura utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros estatísticos dos modelos DRIFTS-PLS de predição da atividade lipase de agentes de cromoblastomicose cultivados em caldo.

Amostras	Região espectral (cm^{-1})	RMSEV	rVal	Variáveis latentes
G4d	650-1460			
4 dias-inóculo diluído	1600-1700	0,029	0,745	14
G4c	900-1300			
4 dias- inóculo concentrado	1650-2000	0,021	0,815	9
G12d	650-1460			
12 dias- inóculo diluído	1650-2000	0,011	0,929	10

O conjunto de espectros de biomassa de 4 dias de cultivo com inóculo diluído, G4d, gerou um modelo PLS-DRIFTS de baixa qualidade (Figura 2 e 3). As frequências selecionadas para a otimização deste modelo foram as regiões (650-1460) + (1600-1700) cm^{-1} e geraram um conjunto de parâmetros estatístico de 0,029 para o RMSEV e 0,745 para o rVal com 14 fatores.

O modelo obtido com cultura de 4 dias porém utilizando inoculo concentrado, G4c, foi de qualidade superior com RMSEV = 0,021 e rVal = 0,815 e 9 variáveis latentes. O melhor modelo de predição da atividade lipase foi obtido com o conjunto de espectros oriundos de amostras cultivadas por 12 dias em inóculo diluído (G12d). Nestas condições e selecionado as regiões de (650-1460) + (1650-2000) cm^{-1} foi possível se chegar a um conjunto de valores de RMSEV = 0,011 e rVal = 0,929 com 10 variáveis latentes.

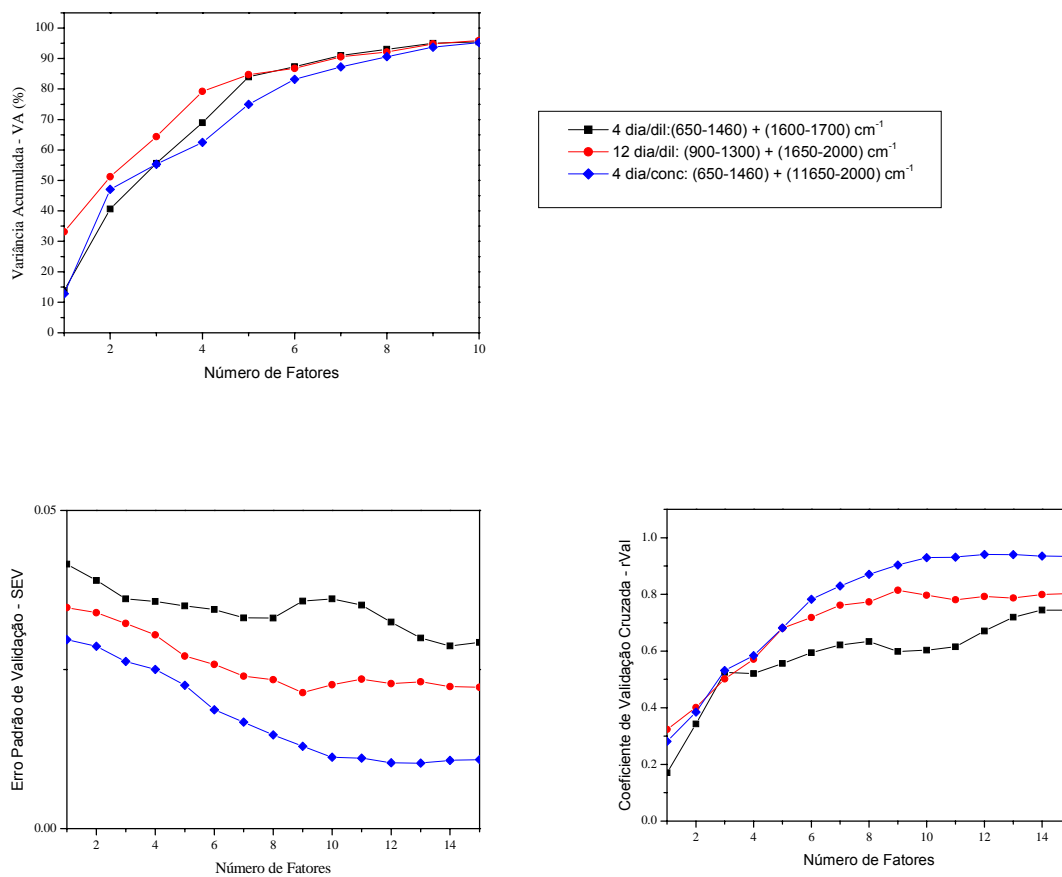


Figura 2 - Curvas de parâmetros estatísticos (VRA, RMSEV e rVal) de modelos de validação cruzada PLS-DRIFTS de biomassa de amostras de agentes de cromoblastomicose de 4 e 12 dias de cultivo em caldo lipase.

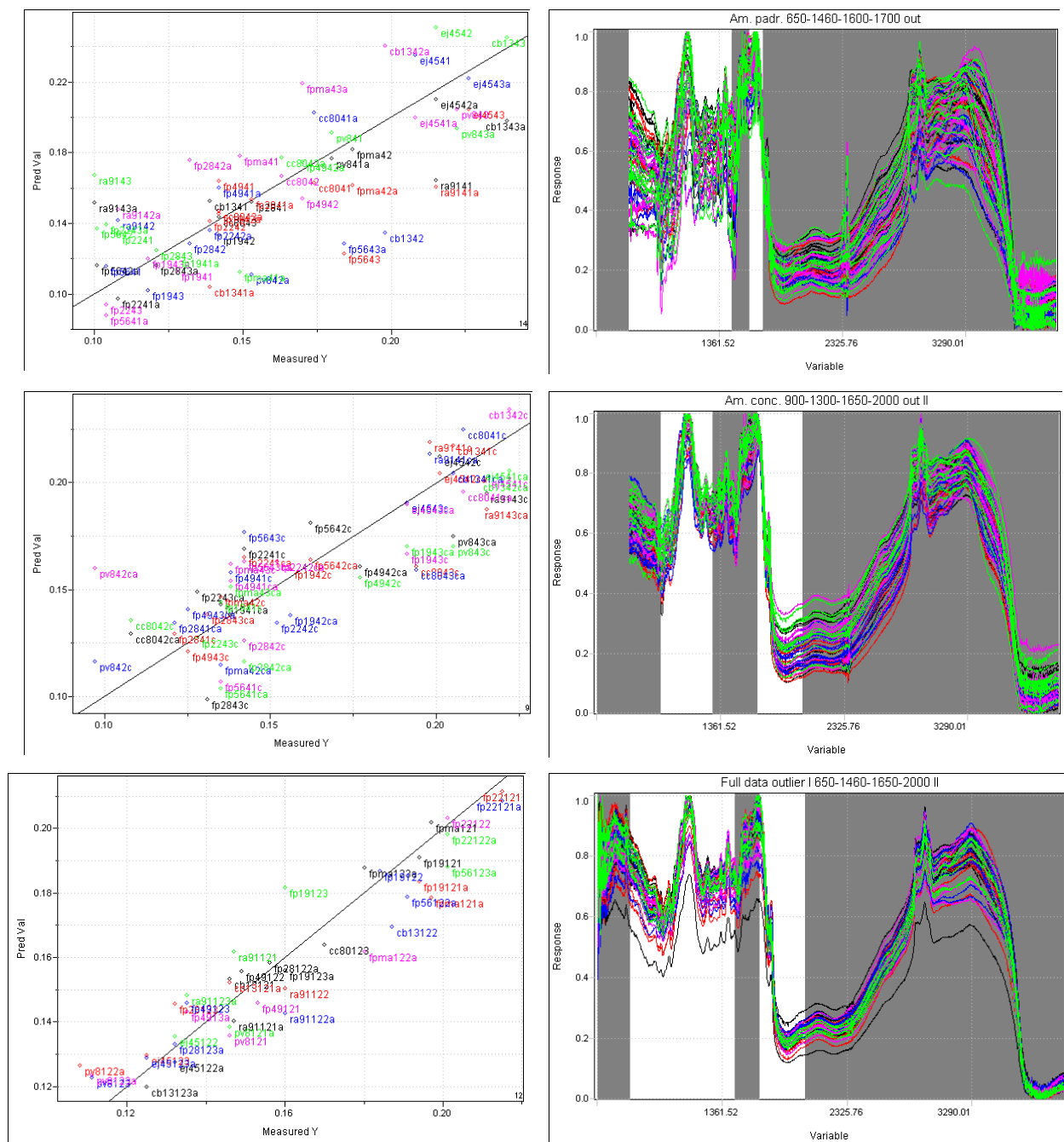


Figura 3 – Regiões espectrais selecionadas (colunas verticais em branco, figuras à direita) e respectivos modelos otimizados de validação cruzada PLS-DRIFTS (figuras à esquerda) de biomassa de amostras de agentes de cromoblastomicose cultivados em caldo lipase.

A observação do conjunto de espectros mostra que o conjunto de biomassas obtidas com 4 dias de idade (figura 3) e inóculo diluído originou um conjunto de espectros muito heterogêneo que pode ter comprometido a otimização do modelo.

Todos os três modelos foram otimizados com exclusão de algumas das amostras consideradas "outliers". Para o modelo de incubação de 4 dias com inóculo diluído foi necessária a retirada de 4 espectros; no modelo de incubação de 4 dias com inóculo concentrado foram retirados 8 espectros e no modelo de incubação de 12 dias foram retiradas 25 espectros.

Com o objetivo de compararmos estatisticamente os modelos que apresentaram os menores valores de RMSEV, obtidos para amostras cultivadas por 4 dias e 12 dias com inóculo diluído, e 4 dias com inóculo diluído e concentrado, aplicamos o teste F.

Quando comparados os modelos obtidos aos 4 e 12 dias de cultivo, com inóculo diluído, foi possível obter diferença estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, enquanto que, ao compararmos os modelos obtidos para as amostras cultivadas por 4 dias com inóculo diluído e concentrado, não observamos diferença estatisticamente significativa.

4 DISCUSSÃO

Uma análise da contribuição de frequências para os modelos de predição indicam que as amostras de biomassa encontram-se em diferentes estágios metabólicos porém com algumas similaridades quanto à atividade lipase. Para as amostras obtidas com 4 e 12 dias de cultivo a partir de inóculos padronizados isto parece lógico pois, conforme as curvas de crescimento microbiano e de atividade lipase há uma diferença significativa entre as mesmas (Figura 1).

Culturas em início de fase platô, porém com elevada atividade encontram-se numa fase mais complexa do seu metabolismo necessitando de informações de vários grupos de biomoléculas para a sua correlação com a atividade lipase avaliada em caldo. Caracteristicamente, nesta fase do metabolismo, o acúmulo de ácidos graxos e de RNA e DNA no interior da célula se correlaciona com a atividade lipase fora da mesma através da inclusão da região de 1600 a 1700 cm^{-1} no modelo (Naumann, 2000). Esta idéia é reforçada pela inclusão da região de absorção de grupos carboxilato ($\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$) e banda de amida III além de absorção de carboidratos e ésteres de ácidos carboxílicos e de fosfato (900-1250 cm^{-1}). A inclusão da região de impressão digital (600-900 cm^{-1}) reforça a idéia de complexidade bioquímica nesta fase do crescimento microbiano para esta classe de fungos no meio em questão.

Com o envelhecimento das culturas (12 dias), estas passam por uma nova fase de produção de lipase (não tão intensa como a primeira, conforme Figura 1). Nesta fase ainda se encontra presente a região de absorção de grupos carbonila oriundos de ésteres de ácidos graxos e de ácidos graxos livres. Mas é adicionada uma região de absorção de anéis aromáticos (1800-2000 cm^{-1}) indicando haver correlação entre a atividade lipase e acúmulo de melanina intracelular.

O modelo obtido com culturas de 4 dias de cultivo a partir de inóculo mais concentrado, G4c, não necessita da região abaixo de 900 cm^{-1} para uma boa correlação com a atividade lipase porém ainda necessita da inclusão de absorção de ésteres, ácidos graxos livres DNA e RNA e de absorção de sistemas aromáticos. Também necessita de bandas relacionadas com movimentos vibracionais de carboidratos, ésteres banda de amida III. Estes dados indicam que estas amostras de biomassa devem se encontrar num estágio intermediário entre os dois anteriores, porém mais próximo das amostras da condição de G4d. A maior atividade lipase de algumas amostras dosadas neste grupo, em relação ao primeiro mostra que algumas amostras

mantêm a assimilação do Tween 80 mesmo em presença de elevado número de células o que contribui para maior taxa de hidrólise e maior consumo de hidróxido de sódio na titulação. Já outras amostras, nesta condição, já passaram da fase de máxima produção e começam a diminuir a atividade lipase em função da diminuição de substrato e do estímulo de indução para a sua produção.

Em todos os três modelos, a presença de absorção em 1650 a 1700 cm^{-1} indica, em maior ou menor extensão, a correlação entre a atividade lipase extracelular e concentração intracelular de biomoléculas relacionados com a hidrólise de ligações ésteres de triglicerídeos. Apesar das culturas de 12 dias se situarem em fase estacionária de crescimento as mesmas continuam com níveis de ácidos nucleicos que se correlacionam com a atividade lipase. Esses podem se devidos a aumento de RNA por ocasião da elevação dos níveis de transcrição genética e síntese de protéica para manter a assimilação de substrato com acúmulo de material de reserva (melanina).

O acompanhamento da atividade lipase de culturas de fungos da cromoblastomicose através da impressão digital metabólica da biomassa via FT-IR mostra o potencial de aplicação desta técnica para monitoramento de uma atividade enzimática extracelular e qual a sua correlação com o metabolismo intracelular. Métodos semelhantes já tem sido descritos para outros processos fermentativos (Helm & Naumann, 1995; Murhammer et al. 1997; Winson, 1997; Vaidyanathan et al, 2000; Vaidyanathan, Harvey & McNeil; 2001, Pons, Bonté & Potier, 2004).

A natureza do meio de cultura (sólido ou líquido) influencia na qualidade de modelos de predição de atividade lipase baseados em análise espectral de biomassa por FT-IR. Em estudos anteriores em meio sólido, de agentes de cromoblastomicose os melhores modelos foram obtidos com cultura de 21 dias em ágar lipase quando comparados com culturas de 14 dias. Nesta condição de cultivo a produção de lipase em placa estabiliza por volta de 14 dias de

cultivo o que indica que com 21 dias a biomassa obtida já apresenta composição característica de células com baixa atividade metabólica.

A mesma informação anterior não é válida para cultivo em caldo onde o crescimento estabiliza já com 4-6 dias de idade. Nestas condições o envelhecimento parece ser mais rápido. Entretanto, os cultivos em caldo mostraram também que a correlação entre atividade lipase extracelular e composição da biomassa melhora sensivelmente com o envelhecimento da cultura. É bem verdade que neste modelo o número de espectros "outliers" retirados (mais de um para uma mesma amostra em alguns casos) foi bem maior que nos demais o que ajudou na sua otimização. Estes dados reforçam a grande variabilidade da composição bioquímica de amostras de fungos da família *Herpotrichiellaceae* obtidos durante cultivo em caldo mesmos para culturas simultâneas (replicatas) de uma mesma amostra e os cuidados que devem ser tomados na padronização de inóculos durante o preparo de experimentos visando estabelecer correlações quantitativas com base em informação espectral da biomassa.

Cultivos em caldo também mostraram que esta classe de fungos apresenta um perfil binodal de produção de lipases: uma taxa de produção elevada com 4 dias ou, melhor dizendo em alta concentração de substrato, e outra em baixa concentração de substrato, em torno de 12 dias. Estes dados podem indicar diferentes mecanismos de adaptação destes fungos há variações da composição de nutrientes do meio extracelular o que pode ser importante para invasão e adaptação em condições agressivas como a pele ou o tecido subcutâneo. A produção de lipases em agentes de cromoblastomicose pode ter relação com a hidrólise de material lipídico produzido durante a infecção do hospedeiro humano uma vez que material desta natureza secretado por fungos como *F. pedrosoi* relacionam-se com a patogenicidade da doença, (Silva e Fazioli, 1985; Silva e Ekizlerian, 1985).

Finalizando, como lipases são proteínas, a sua produção por estes fungos sugere que as mesmas possam servir como novos antígenos para identificação e diferenciação espécies da

família *Herpotrichiellaceae* por métodos imunológicos ou mesmo para monitoramento da evolução da terapia em pacientes infectados semelhante a outros antígenos já utilizados (Iwatsu et al., 1982; Barros & Resende, 1999).

5 CONCLUSÕES

Agentes de cromoblastomicose quando cultivados em caldo à base de Tween 80 como substrato para indução de atividade lipase apresentam duas fases de produção de lipase. Em uma fase inicial do cultivo (4 dias) a atividade lipase é elevada e, após um decréscimo, volta a aumentar após cerca de 10 dias.

É possível prever a atividade lipase dos filtrados de cultura de espécies de *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantianum*, *Rhinoctadiella aquaspersa* e *Exophiala jeanselmei* através da análise espectral por FT-IR da impressão digital metabólica da biomassa correspondente. A previsão é dependente da fase de crescimento em que se encontram as culturas sendo que culturas com 12 dias apresentam melhor correlação que culturas de 4 dias.

Através da técnica de DRIFTS é possível acompanhar alterações metabólicas na biomassa de culturas de *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora bantianum*, *Cladosporium carrionii*, *Rhinoctadiella aquaspersa* e *Exophiala jeanselmei* que se correlacionam com a atividade lipase extracelular.

6 REFERÊNCIAS

BARROS, T.F., RESENDE M.A. Partial characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 1999, 41, 343-350.

BASTERT, J., KORTING, H.C., TRAENKLE, P., SCHMALRECK, A.F. Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Mycoses, 1999, 42, 525-528.

CALIGIORNE, R. B., et al., Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1999, ano 2 vol. 11, 22 - 25.

DE HOOG, G.S., QUEIROZ-TELLES F., HAASE, G., FERNADEZ-ZEPPEFELDT, G., ANGELIS D.A., VAN DEN ENDE A.H.G.G., MATOS T., PELTROCHE-LLACSAHUANGA H., PIZZIRANI-KLEINER A.A., RICHARD-YEGRES N., VICENTE V., YEGRES F. Black Fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*, 2000, 38, Suppl I, 243-250.

ESSENDUBI, M., TOUBAS D., BOUZZAGOU M., PINON J-M., MANFAIT M., SOCKALINGUN G.D. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1724, 239-247.

FARBIARZ, S.R., DE CARVALHO T.U., ALVIANO C., DE SOUZA W. INHIBITORY Effect of melanin on the interaction of *Fonsecea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *J. Med. Vet. Mycol*. 1992, 30, 265-273.

FISCHER, F., COOK N.B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Trad: FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2001, 337p.

FISCHER, G., BRAUN S., THISSEN R., DOTT W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J. Microbiol. Method.* 2006, 64, 63-77.

GOODACRE, R., TIMMINS E.M., ROONEY P.J., ROWLAND J.J., KELL D.B. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial networks. *FEMS Microbiol Lett.*, 1996, 140, 233-239.

IWATSU, T., MIYAJI M., TAGUCHI H., OKAMOTO S. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* and *Exophiala jeanselmei*. *Mycopathologia*, 1982, 77, 59-64.

KNEIPP, L.F. PALMEIRA V.F., PINHEIRO A.A.S., ALVIANO C.S., ROZENTAL S., TRAVASSOS L.R., MEYER-FERNANDES J.R. Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecea pedrosoi*. *Med. Mycol.*, 2003, 41, 469-477.

LIMONGI, C.L. ROZENTAL S., ALVIANO C.S., DE SOUZA W. The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecea pedrosoi* with Chinese Hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia*, 1997, 138, 127-135.

LIMONGI, C.L., ALVIANO C.S., DE SOUZA W., ROZENTAL, S. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Fonsecea pedrosoi*. *Med. Mycol.* , 2001, 39, 429-437.

MARIEY, L., SIGNOLLE J.P., AMIEL C., TRAVERT J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*. 2001, 26, 151-159.

MCGINNIS, MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1983, 8, 1-16.

MURHAMMER, D.W., RILEY, M.R., RHIEL, M., ARNOLD, M.A., WALLS, E.L., DELACRUZ, N. Simultaneous monitoring of multiple cellular metabolites in bioreactors by near-infrared spectroscopy. *Abstr, Pap. Am. Chem. Soc.* 1997, 213, 135.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2000, 102-131.

PLOTKIN L.I. SQUIQUERA L., MATHOV I.; GALIMBERTI R.; LEONI J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. *Med. Mycol.* , 1996, 34, 43-48.

PONS, M.-N., BONTÉ, S.L. POTIER, O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization. *J. Biotechnol.* 2004, 113, 211-230.

RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F., ZEPPEFELDT G. Chromomycosis; endemia rural, laboral y familiar en Venezuela. *Rev. Iberoam. Micol.* 1992, 9, 38-41.

ROZENTAL S.ALVIANO C.S., DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia.*, 1994, 126, 85-91.

SCHALLER, M., BORELLI C., KORTING H.C., HUBE B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005, 48, 365-377.

VAIDYANATHAN, S., ARNOLD, A., MATHESON, L., MOHAN, P., MACALONEY, G., MOHAN , P., MACALONEY, G., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Critical evaluation of models developed of monitoring and industrial submerged bioprocess for antibiotic production using near-infrared spectroscopy. *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16, 1098-1105.

VAIDYANATHAN, S., HARVEY, L.M., MCNEIL, B. Deconvolution of near-infrared spectral information for monitoring mycelial biomass and other key analytes in a submerged fungal bioprocess. *Anal. Chim. Acta*. 2001, 428, 41-59.

VAN DER MEI, H.C., NAUMANN D., BUSSCHER H.J. Grouping of oral streptococcal species using fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Archiv. Oral Biol*. 1993, 38, 1013-1019.

WINSON, M.K., GOODACRE R.,TIMMINS, E.M., JONES A., ALSBERG B.K., ROWLAND J.J., KELL D.B. Diffuse reflectance absorbance spectroscopy taking in chemometrics (DRASTIC). A hyperspectral FT-IR-based approach to rapid screening for metabolite overproduction. *Anal. Chim. Acta.*, 1997, 238, 273-282.