



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA SOARES LASSIE

**SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR
Burkholderia sp. COM AÇÃO ANTIFÚNGICA EM
Candida spp.**

Londrina
2014

FLAVIA SOARES LASSIE

**SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDA POR
Burkholderia sp. COM AÇÃO ANTIFÚNGICA EM
Candida spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central
da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L347s Lassie, Flavia Soares.

Substâncias bioativas produzida por *Burkholderia* sp. com ação antifúngica em *Candida* spp. / Flavia Soares Lassie. – Londrina, 2014.
62 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Candida* – Teses. 2. Leveduras (Fungos) – Teses. 3. Microorganismos patogênicos – Teses. 4. Agentes anti-infecciosos – Teses. 5. Bactérias gram-negativas – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579:582.28

FLAVIA SOARES LASSIE

**SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR *Burkholderia* sp.
COM AÇÃO ANTIFÚNGICA EM *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr Admilton Gonçalves de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de março de 2014.

Dedico primeiramente este trabalho a Deus,
minha luz, meu guia, minha fé.
Conduziu todos os meus caminhos
durante essa jornada,
autor do meu destino.
Agradeço pelas pessoas que
colocou em meu caminho
abençoando nossa relação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Maria de Lourdes, por toda dedicação durante a minha educação e formação. Por todo amor, carinho e compreensão que tiveram comigo durante todo este período e a vida. Pais muito obrigada!

Ao meu irmão, Pedro pela paciência nos momentos de nervosismo e desespero.

As minhas primas (irmãs), Cristina e Priscila por sempre estarem presentes mesmo de longe em todas as etapas do nosso crescimento.

Ao meu namorado e amigo, Allan por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por todo o apoio e força nos momentos difíceis.

A minha segunda família em Londrina, Eduardo, Mariângela e Mayara por todo o carinho dedicado.

Aos meus eternos amigos, Gissele, Aline e Fulvio, por estarem sempre me apoiando em todos os momentos de minha vida.

Ao amigo, Duarte, por sempre confiar em mim e me incentivar à sempre fazer o melhor.

Ao orientador, prof. Dr. Galdino Andrade, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Ecologia Microbiana, pelo seu profissionalismo e por ter sido compreensivo e paciente.

Ao prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira, por todo ensinamento e incentivo durante a realização deste trabalho.

À prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela sua contribuição em todas as etapas deste trabalho, e por gentilmente ceder às cepas utilizadas neste trabalho.

Ao prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey, por toda a sua disposição e auxílio na realização deste trabalho.

Às docentes do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina, em especial as prof^a Dr^a Márcia Perugini e Dr^a Eliana Carolina Véspero pela atenção, convívio e encorajamento durante toda a formação profissional e pessoal.

À Lucinha, pelo seu ensinamento e auxílio o que tornou possível à realização deste trabalho e também por todo carinho em todos os momentos que passamos juntas.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Ane, Mayara, Jamile, Carol Polano, Bárbara, Vanessa, Deise, Miguel, Marta Cleverson, Carol Martins, Glenda, Viviana, pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Às minhas amigas e companheiras de curso Juliana e Luana. Muito obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelo apoio, pela amizade!

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e orientação.

À Coordenação da Pós Graduação em Microbiologia, por fornecer condições para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LASSIE, Flávia Soares. **Substâncias bioativas produzidas por *Burkholderia* sp. com ação antifúngica em *Candida* spp.**.2014. 61f. Dissertação (Mestre em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são comensais colonizando o trato gastro intestinal e genital. Estes micro-organismos são oportunistas e responsáveis por 15% dos casos de infecções adquiridas nos hospitais, sendo assim um patógeno de importância clínica. Nos últimos anos têm ocorrido modificações na epidemiologia destas infecções, com um aumento no número de casos de espécies não *albicans* em infecções invasivas. A emergência de infecções fúngicas e a ocorrência de resistência intrínseca e adquirida têm refletido no aumento da busca por novos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica das substâncias extracelulares produzidas pela cepa RV7S3 (*Burkholderia* sp.) para o controle de leveduras do gênero *Candida*. Foram realizadas a identificação e a caracterização bioquímica da substância. Avaliou-se a atividade antifúngica por testes de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM), e o efeito da ação desta substância sobre a formação de biofilme. A atividade hemolítica também foi avaliada. Os dados sugerem que a provável substância antifúngica apresenta atividade de uma lipase, uma enzima da classe das hidrolases. A menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento fúngico foi de $0,38 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pelo teste de difusão em ágar observou-se formação de halos de inibição do crescimento fúngico com diâmetro igual ou superior a 10 mm, apresentando média de $17,5 \pm 0,5$ mm. Este produto apresentou baixa atividade hemolítica. A substância antifúngica provocou a redução da viabilidade celular do biofilme. A atividade antifúngica, a baixa atividade hemolítica sugerem o potencial desta provável hidrolase como agente antifúngico, entretanto novos estudos farmacológicos e bioquímicos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras Chave: Leveduras; Produção de antimicrobiano; Lipase; Antifúngicos.

LASSIE, Flávia Soares. **Bioactive substances produced by *Burkholderia sp.* with antifungal activity in *Candida spp.***. 2014. 61p. Thesis (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Candida species are commensal colonizing the gastrointestinal and genital tract. These micro-organisms are opportunistic and caused around 15% of infections cases acquired in a hospitals, and it is a pathogen of clinical importance. In recent years was observed some changes in the epidemiology of these infections, increasing the number of cases of non-*albicans* which species causing invasive infections. The emergence of fungal infections and the occurrence of intrinsic and acquired resistance are reflecting the increased interest to search new antimicrobials. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of extracellular polypeptides produced by strain RV7S3 (*Burkholderia sp.*) to control a *Candida spp.* The identification and biochemical characterization of the substance and the antifungal activity were carried out as agar diffusion as a minimum inhibitory concentration (MIC). The hemolysis tests were also evaluated. The results suggest that the antifungal substance is likely a lipase, an enzyme of the hydrolase class. The protein showed a MIC with 038 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the diffusion in agar the inhibition zone formed halo with 17.5 ± 0.5 mm diameter. The hemolysis tests were low. The antifungal substance decreased the cell viability of the biofilm. The antifungal activity plus a low cytotoxicity and hemolytic activity shows a great potential of this polypeptide will be an antifungal agent, however a new pharmacological and biochemical studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: Yeast, Production of antimicrobial, Lipase, Antifungal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1-** Biofilme de *Candida glabrata* (ATCC 2001) em Caldo Sabouraud em 48h de incubação.....20
- Figura 2-** Alvos celulares dos fármacos antifúngicos.....21
- Figura 3-** Estrutura molecular de antifúngicos azóis. Molécula de imidazol (cetoconazol) e molécula de triazol (fluconazol).....22
- Figura 4-** Ação da anfotericina B formando poros na membrana plasmática de fungos.....23
- Figura 5-** Reações de biotransformações de lipídios.....28
- Figura 6-** Ação catalítica da lipase: hidrólise de triacilglicerídeo formando glicerol e ácidos graxos.....29

ARTIGO

- Figura 1-** Efeito do pH na atividade enzimática do extrato precipitado produzido por *Burkholderia* sp.....58
- Figura 2-** Termoestabilidade do extrato enzimático bruto.....58
- Figura 3-** Perfil cromatográfico de exclusão molecular utilizando coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC e PBS pH 7.4. Frações com atividade antifúngica encontradas nos tubos, 14, 15 e 16.....59
- Figura 4-** Atividade biológica das frações testadas com leitura em espectrofotômetro 530 nm.....59
- Figura 5-** Atividade antifúngica sobre formação de biofilme pelo método de XTT.....60
- Figura 6-** Atividade Antifúngica do extrato precipitado sobre biofilme de *C. glabrata* por microscopia de fluorescência.....61

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1- Titulação do ensaio de hemólise.....	62
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA- Food and Drug Administration

RNA- Ácido Ribonucléico

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

MFS- Superfamília dos Facilitadores Maioritários

Epa- Adesinas epiteliais

ATCC- American Type Culture Collection

KDa- Quilodaltons

UV- Ultra- violeta

CIM- Concentração Inibitória Mínima

r RNA- Ácido Ribonucléico Ribossômico

AN- Ágar Nutriente

AS- Ágar Sabouraud

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

TTC- 2,3,5- Triphenyl- tetrazolium chloride

p NPP- p Nitrophenyl Phosphate

PBS- Phosphate buffered saline

MTT- 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

SFB- Soro Fetal Bovino

pH- Potencial Hidrogeniônico

SDS-PAGE- Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Eletrophoresis

PAGE- Polyacrylamide Gel Eletrophoresis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> DE INTERESSE CLÍNICO E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES FÚNGICAS	17
3.1.1 <i>Candida</i> sp.	17
3.1.2 Biofilme	19
3.2 ANTIFÚNGICOS	21
3.2.1 Mecanismos de resistência das células planctônicas aos antifúngicos	24
3.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBIÓTICOS POR BACTÉRIAS	26
3.3.1 <i>Burkholderia</i> sp.	27
3.4 LIPASES	28
3.4.1 Lipases microbianas	320
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO	41

1 INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de micoses graves continua sendo um problema de saúde pública, apesar do tratamento com agentes antifúngicos. Estas infecções são importantes causa de morbimortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (ESPINEL- INGROF et al., 2009).

Espécies de *Candida* são a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas, como infecções de corrente sanguínea, de líquidos corporais estéreis, de tecidos e órgãos. Das espécies de *Candida* que causam infecções em humanos, *Candida albicans* é a mais prevalente, sendo isolada em 42,1% dos casos. Entretanto, estudos têm mostrado que o número de casos de infecções por *Candida* não *albicans* tem aumentado significativamente, especialmente por *Candida glabrata* (26,7%). Pfaller et al. (2012) relataram que 57,9% dos casos de candidemia foram causadas por *Candida* não *albicans*, enquanto *C. albicans* foi responsável por 42,1%.

Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas estão relacionados a utilização de antibióticos de largo espectro, cateteres e nutrição parenteral, cirurgias de grande porte, rompimentos de barreiras como mucosas, e o uso de imunossupressores entre os quais, quimioterapia e radioterapia (PFALLER et al., 2012).

Diversas razões justificam a necessidade de novos agentes antimicrobianos como o fato de as doenças infecciosas serem a segunda maior causa de mortalidade no mundo; altas taxas de resistência dos microorganismos aos antimicrobianos, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo Food and Drug Administration; a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos disponíveis comercialmente. (GUIMARÃES et al., 2010).

Sabe-se que as bactérias são fontes promissoras para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. A platensimicina, isolada de *Streptomyces platensi*, apresentou atividade inibitória de amplo espectro

contra bactérias Gram positivas e encontra-se em fase de estudos pré-clínicos (GUIMARÃES, 2010). A pesquisa de novos antibióticos é contínua, com o objetivo de combater patógenos, bactérias e fungos, naturalmente resistentes e aqueles que desenvolvem resistência. Visa também, melhorar as propriedades farmacológicas dos fármacos (DEMAIN, 2000).

Entre os micro-organismos produtores de antibióticos destacam-se bactérias do gênero *Burkholderia*, que produzem antimicrobianos contra fungos e bactérias tais como: pirrolnitrina, cepacina A e B, cepacidina A, entre outros (EL-BANNA, WINKELMANN; 1998; PARKER et al., 1984; LEE et al., 1994).

Dessa forma, neste trabalho foram pesquisadas substâncias bioativas produzidas por *Burkholderia* sp. com ação em leveduras do gênero *Candida*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica das substâncias extracelulares produzidas pela cepa RV7S3 (*Burkholderia* sp.) no controle de leveduras do gênero *Candida*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Obter substâncias bacterianas extracelulares com atividade antimicrobiana contra o crescimento de leveduras do gênero *Candida*;

2.2.2 Caracterizar por métodos bioquímicos o extrato enzimático parcialmente purificado;

2.2.3 Avaliar a atividade antifúngica *in vitro*, por teste de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima, com a fração mais ativa, contra leveduras do gênero *Candida*;

2.2.4 Avaliar a atividade antifúngica sobre a formação de biofilme de *Candida*;

2.2.5 Avaliar a atividade citotóxica em hemácias de carneiro;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* DE INTERESSE CLÍNICO E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES FÚNGICAS

3.1.1 *Candida* sp.

O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies, mas apenas uma minoria está relacionada à candidíase humana, uma vez que cerca de 65% das espécies são incapazes de crescer à temperatura de 37 °C, o que permitiria se desenvolver como agentes patogênicos ou comensais de seres humanos. Existem mais de 17 espécies de *Candida* causadoras de infecções em humanos e mais de 90% das infecções fúngicas invasivas são causadas por espécies de *Candida* (RODRIGUES et al., 2013). Entre elas destacam-se *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*. Contudo, outras espécies de *Candida*, como *C. lusitaniae* e *C. krusei* vêm aumentando sua incidência nas últimas décadas (HAZEN, 1995; ZER et al., 2002). *C. albicans* é a espécie de levedura que mais frequentemente causa infecções, porém as espécies não-albicans, como *C. glabrata* vem emergindo em pacientes em unidades de terapia intensiva (LIMA et al., 2006).

As leveduras do gênero *Candida* quando em meio solidificado, contendo ágar Sabouraud dextrose, apresentam colônias mucoides ou secas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada, visíveis após 24- 48 horas de incubação. Microscopicamente, as células são globosas, ovaladas ou ovalada-alongadas, medindo 3-30 µm de diâmetro. Estas se reproduzem assexuadamente por brotamento, no qual saliências protoplasmáticas surgem a partir da célula mãe e crescem até finalmente se separarem para formar uma nova célula.

Estes agentes são comumente designados como patógenos oportunistas, por fazerem parte da microbiota normal do homem e de outros animais, colonizando mucosas do trato gastrointestinal (50 a 70%), boca (30 a

50%), vagina (5 a 30%) e pele (4 a 7%) (CASTRO et al., 2006; CASTRO e LIMA, 2010).

A infecção por algumas espécies de *Candida* pode ser facilitada pela capacidade destes micro-organismos desenvolverem micélio e pelo formato tubular da sua forma filamentosa, o qual diminui a capacidade de ser fagocitada por células do sistema imunológico e proporciona maior aderência à superfície da célula (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990). *C. albicans* e *C. dubliniensis* são espécies capazes de crescer na forma leveduriforme ou na forma de hifa e pseudohifa (CLAUDINO, 2007). *C. albicans* só ocorre no solo ou na água quando os mesmos são contaminados por dejetos humanos e de animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A maior parte das infecções causadas por *C. albicans* é de origem endógena, porém a transmissão exógena, principalmente intra-hospitalar, tem sido relatada, inclusive com outras espécies do gênero. A candidíase da mucosa oral, também chamada de estomatite cremosa ou sapinho, caracteriza-se pelo aparecimento de placas brancas, isoladas ou confluentes, aderentes à mucosa, com aspecto membranoso, às vezes rodeadas por halo eritematoso. Essa forma de micose é a mais frequente em pacientes imunossuprimidos e em recém-nascidos quando associada à candidíase da mucosa vaginal da mãe. A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WINGETER et al., 2007). Na mucosa vaginal, as lesões assemelham-se às da boca e são encontradas principalmente em mulheres grávidas com corrimento, em diabéticas ou em pacientes que receberam terapêutica antimicrobiana prolongada (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Candidemia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos serviços de saúde. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente descrita nestes casos, porém o isolamento de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* vem aumentando e varia de acordo com estudos populacionais conduzidos nas diferentes áreas geográficas. No Norte Europeu e nos Estados Unidos da América há relatos de elevados números de casos relacionados à *C. glabrata*, já na Espanha e no Brasil há diminuição do número de casos

provocados por *C. glabrata* e aumento do número de casos por *C. parapsilosis* (GUINEA, 2013).

Hii et al. (2013), relataram as mudanças na epidemiologia desta infecção fúngica em um Hospital de Taiwan, apesar de *C. albicans* ainda ser a espécie mais frequentemente descrita, as taxas de candidemia desta espécie diminuíram de 64,8% para 43,6%, já a proporção de *C. glabrata* aumentou de 1,1% para 21,6%.

O perfil demográfico do paciente e a exposição à antifúngicos também influenciam na distribuição e frequência de *Candida* spp. *C. albicans* é mais frequente em pacientes com idade de até 18 anos, já *C. glabrata* é comumente relatada em pacientes com idade avançada (GUINEA, 2013).

Inicialmente *C. glabrata* foi classificada no gênero *Torulopsis*, devido a falta de pseudohifas. Em 1978 confirmou-se que a espécie não apresentava crescimento dimórfico, apenas a forma de blastoconídios, então sugeriu-se que *Torulopsis glabrata* fosse classificado no gênero *Candida* (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL; 1999). O genoma de *C. glabrata* foi sequenciado mostrando um ancestral comum o *Saccharomyces cerevisiae* (DUJON et al., 2004).

Em meio ágar Sabouraud dextrose, *C. glabrata* apresenta colônias brilhantes, lisas, creme e são menores do que aquelas produzidas por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Já em meio CHROMagar[®] *Candida*, forma colônias brancas, rosa ao roxo (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES; 2013).

3.1.2 Biofilme

A patogenicidade das espécies de *Candida* está associada a expressão de fatores de virulência que contribuem para a evasão das defesas do hospedeiro, adesão, formação de biofilme, principalmente em dispositivos

médicos e a produção de enzimas hidrolíticas como as proteases, fosfolipases e hemolisinas (RODRIGUES et al., 2013).

Biofilme é uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos, com um extraordinário grau de organização celular envolta por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a uma superfície ou interface (RODRIGUES, 2013; HENRIQUES, 2013). A capacidade de espécies de *Candida* em formar biofilmes é um importante fator que contribui para causar doenças em humanos (RAJENDRAN et al., 2010). De maneira geral as células sésseis dentro dos biofilmes são menos sensíveis aos agentes antimicrobianos do que as células planctônicas (KUHN, 2004; GHANNOUM, 2004).

C. glabrata coloniza tecidos, bem como superfícies abióticas, nas quais se desenvolve o biofilme, mesmo não apresentando capacidade de formar filamentos. Espécies de *Candida* aderem aos tecidos através de proteínas específicas, chamadas de adesinas, e em *C. glabrata* estas são denominadas *Epa* (adesinas epiteliais) (RODRIGUES et al., 2013).

A habilidade de formar biofilme auxilia *C. glabrata* a sobrevivência como organismo comensal e patogênico de seres humanos, aumentando sua capacidade de evadir da resposta imune do hospedeiro, de resistir aos tratamentos antifúngicos e suportar a pressão competitiva com outros micro-organismos (SILVA et al., 2010).

Comparando a formação de biofilme de *C. glabrata* com outras espécies de *Candida*, a atividade metabólica do biofilme e das células planctônicas é menor do que das outras espécies. A biomassa total também é menor quando comparado com espécies não *albicans* como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (SILVA et al., 2010).

O biofilme formado por *C. glabrata* é composto por múltiplas camadas de blastoconídios, com ausência total de hifas e pseudohifas, sendo a matriz rica em proteínas e hidratos de carbono (Figura 1). Os polissacarídeos extracelulares são muito importantes para compor a matriz do biofilme, e o de maior relevância para as leveduras é o β 1,3- glucano o qual está associado à proteção dos micro-organismos contra agentes antifúngicos (SILVA et al., 2009).

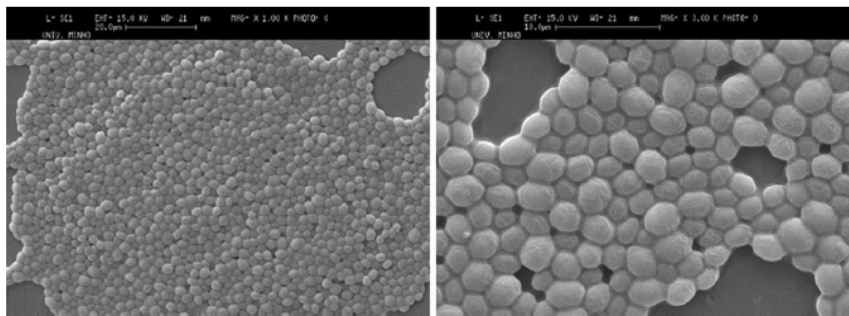


Figura 1- Biofilme de *Candida glabrata* (ATCC 2001) em Caldo Sabouraud em 48 h de incubação. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20401483>

3.2 ANTIFÚNGICOS

Poucos antifúngicos estão disponíveis comercialmente, quando comparados aos antibacterianos. A dificuldade de se alcançar a toxicidade seletiva nas células fúngicas é maior do que nas células bacterianas, visto que os fungos por serem células eucarióticas apresentam sua maquinaria celular semelhante à dos animais. Assim os fármacos antifúngicos que afetam o metabolismo da célula fúngica frequentemente atuam nas mesmas vias metabólicas do hospedeiro, tornando-os tóxicos (ESPINEL- INGROFF, 2009).

As micoses são de difícil tratamento devido ao número limitado de agentes antifúngicos disponíveis e a aquisição de resistência aos fármacos, antifúngicos poliênicos e azóis que constituem o principal recurso terapêutico. O fluconazol é o principal fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por *Candida* sp., entretanto tratamentos por longo período de tempo e exposições repetitivas podem resultar no desenvolvimento de resistência a este fármaco (SANGLARD et al., 1995).

Os antifúngicos são classificados com base no sítio-alvo e na estrutura química (Figura 2).

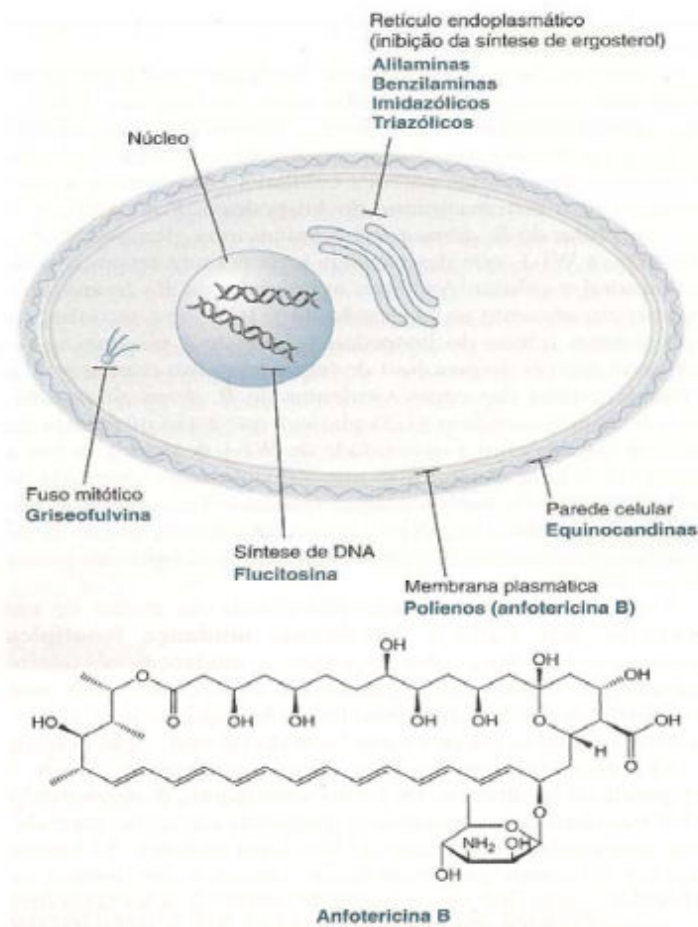


Figura 2- Alvos celulares dos fármacos antifúngicos. Fonte: SteinJ. Internal Medicine. Mosby. St. Louis. 199412

As principais classes de antifúngicos existentes são:

- azóis: agentes fungistáticos sintéticos que possuem amplo espectro de ação, agem principalmente em leveduras e fungos filamentosos como *Trichosporon* sp. Os principais fármacos disponíveis incluem fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol. Esses fármacos inibem a atividade da enzima lanosterol 14α - desmetilase, uma enzima chave na biossíntese do ergosterol, alterando a estrutura da membrana plasmática dos fungos (BAKER et al., 2004; DEMAIN, 2009; SANCHEZ, 2009). Esses antifúngicos são amplamente utilizados para tratamento de vasta gama de infecções causadas por *Candida*, particularmente em indivíduos HIV positivos com candidíase orofaríngea (SAAG e DISMUKES, 1988), infecções na medula óssea e em pacientes transplantados renais.

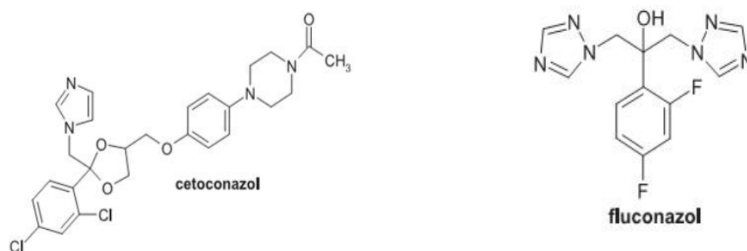


Figura 3- Estrutura molecular de antifúngicos azóis. Molécula de imidazole (cetoconazol) e molécula de triazol (fluconazol). Adaptada de Pereira, (2007).

- alilaminas: agentes de origem sintética, inibem a enzima esqualeno epoxidase que está envolvida na síntese do ergosterol a partir do esqualeno na parede celular dos fungos. A diminuição do ergosterol e o acúmulo de esqualeno afetam a estrutura e função da membrana, como a troca de nutrientes. O principal fármaco representante desta classe é a terbinafina que é utilizada no tratamento de infecções fúngicas da unha (DEMAIN, 2009; SANCHEZ, 2009).
- fluoropirimidinas: flucitosina (5- fluorocitosina) é um pró-fármaco, atua interferindo na biossíntese de ácidos nucleicos. Após ser convertida em 5-fluoroacila pela enzima citosina deaminase, substitui a uracila por 5-fluorouracila no RNA do fungo, gerando erros de codificação do RNA e inibição de síntese de DNA e proteínas (DEMAIN, 2009; SANCHEZ, 2009).
- griseofulvina: derivada de *Penicilium griseofulvum*, inibe a mitose das células fúngicas pela sua ligação à tubulina e a uma proteína associada aos microtúbulos, rompendo, assim a organização do fuso mitótico (RANG et al., 2009).
- polienos: se ligam às membranas celulares e interferem na permeabilidade e nas funções de transporte, formando um poro na membrana, provocando assim a perda de íons potássio intracelulares (Fig. 4). Os principais fármacos que compõem esta classe são a anfotericina B (uso sistêmico) e a nistatina (uso tópico). A anfotericina B exerce ação seletiva, ligando-se a membrana de fungos, apresentando maior afinidade ao ergosterol do que o colesterol de mamíferos. Estes fármacos mostram-se ativos contra a maioria de fungos e leveduras (DEMAIN, 2009; SANCHEZ, 2009).

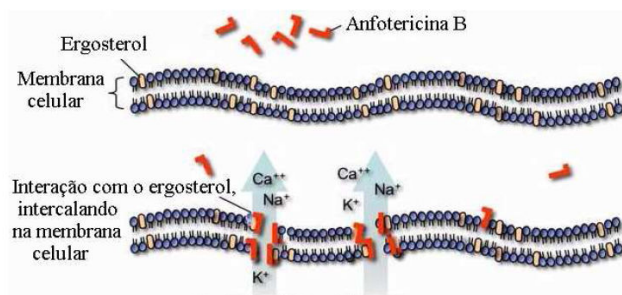


Figura 4- Ação da anfotericina B formando poros na membrana plasmática de fungos.

-equinocandinas: são peptídeos cíclicos semissintéticos. Os principais representantes desta classe são caspofungina, micafungina e anidulafungina. A micafungina apresenta amplo espectro de ação em espécies de *Candida*. Segundo Messer et al. (2006), este novo fármaco apresentou boa atividade *in vitro* contra isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Este antifúngico age inibindo a síntese de glucana presente na parede celular de fungos, por meio da inibição da enzima β 1,3-glucana sintase. A inibição desta enzima causa um esgotamento dos polímeros de glucana na célula, resultando em uma parede celular anormal, fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico. Toxicidade associada à equinocandina é rara, pois sua ação é específica sobre a glucana presente na parede celular, e as células de mamíferos não possuem essa estrutura (CHEN e SORRELL, 2007).

3.2.1 Mecanismos de Resistência das células planctônicas aos antifúngicos

A maioria dos isolados *C. albicans* é sensível a todos os agentes antifúngicos disponíveis. Entre as espécies não-*albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também são sensíveis aos azóis. *C. tropicalis* possui menor sensibilidade ao fluconazol do que *C. albicans*. *C. lusitanae*, responsável por 1–2% das candidemias é sensível aos azóis, porém possui alta resistência intrínseca a anfotericina B (SINGH, 2001; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008; CRUCIANI e SERPELLONI, 2008). *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e *C. glabrata* desenvolve resistência rapidamente após contato

com este fármaco. Ambas têm emergido como importantes agentes em infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados (REX et al., 2000; SPELLBERG et al., 2006). No entanto, seus mecanismos moleculares de resistência ainda são poucos conhecidos e necessitam de maiores estudos (GUINEA et al., 2006; ROGERS et al., 2006).

O constante e inadequado uso de antifúngicos, pode ter proporcionado à seleção de isolados resistentes, tornando muitos fármacos ineficientes. A resistência clínica é observada nas últimas décadas principalmente em pacientes imunocomprometidos com candidose de orofaringe. O estudo de mecanismos genéticos que originam a resistência a um antibiótico é fundamental para orientar a adequada utilização do fármaco, pois esta vem sendo a forma de intervenção mais amplamente utilizada no combate às infecções (CASALI et al., 2003).

Existem diferentes tipos de mecanismos de resistência a fármacos em eucariotos. O mecanismo mediado pela superexpressão de bombas de efluxo é bastante estudado em espécies de *Candida*. Neste, o efluxo de fármacos é facilitado por dois tipos de bombas que estão localizadas na membrana citoplasmática: os transportadores ABC, que utilizam ATP como fonte de energia para impulsionar o transporte e os transportadores da Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS). Esse mecanismo leva a diminuição do acúmulo celular de fármaco e, portanto acabam sendo insuficientes para a inibição de seus alvos (MORSCHHÄUSER, 2009; RODLOFF et al., 2011).

Outro mecanismo é a alteração na composição dos esteróis e no alvo dos antifúngicos (MARICHAL et al., 1999; SANGLARD, 2002). A afinidade reduzida da ligação da 14 α -desmetilase ao antifúngico parece ser um importante determinante de resistência em diversas leveduras. O aumento da atividade desta enzima e altos níveis de ergosterol são observados em cepas resistentes (ZAITZ et al., 1998). O *ERG11* é o gene que codifica a proteína citocromo P450 14 α -desmetilase em diversas espécies de interesse médico, incluindo *Cryptococcus* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Candida* spp. (REVANCAR et al., 2004). Várias mutações de ponto na sequência do gene *ERG11* resultam em mudanças de aminoácidos na proteína que levam a alterações conformacionais resultando no decréscimo da afinidade desta aos

antifúngicos azólicos (SANGLARD, 2002, RODERO, 2003). Em relação a P450 14 α -desmetilase a resistência também pode ocorrer devido ao aumento da concentração desta enzima no interior celular, isto pode ocorrer pelo aumento da taxa de transcrição do gene *ERG11* ou pela amplificação cromossômica do mesmo (MARICHAL et al., 1999).

A pré-exposição ao fármaco pode resultar no rápido desenvolvimento de resistência antifúngica *in vivo*, podendo selecionar clones resistentes ou conjuntos de células resistentes em uma população heterogênea, fenômeno denominado de heteroresistência. A presença da droga também pode influenciar a transcrição de genes de resistência dentro de uma população clonal de células. Este fenômeno foi documentado em leveduras do gênero *Candida* (MARR, 2001) e *Cryptococcus* (MONDON, 1999; YAMAZUMI, 2003).

3.3 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR BACTÉRIAS

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (Guimarães et al., 2010).

As bactérias dos gêneros: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Streptomyces* (Raaijmakers et al., 2002), destacam-se por produzirem inúmeros compostos metabólicos que apresentam atividade antibiótica. O interesse crescente por bactérias produtoras de antibióticos está relacionado a necessidade de descobrir novos fármacos, mais eficientes do que os existentes no mercado, além do interesse na utilização como biocontrole. Oliveira et al. (2011) descreveram a produção de metabólitos por *Pseudomonas* sp. contra *Xanthomonas citri* pv. *citri*, causadora do cancro cítrico.

Pseudomonas sp. intrinsicamente relacionada ao gênero *Burkholderia* sp. produz as cepafunginas I, II, III, que são classificados como acilpeptídeos neutros, solúveis em soluções alcoólicas e em dimetil sulfóxido.

Estes possuem atividade inibitória contra fungos e leveduras como *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e etc (SHOJI et al., 1989).

Nishida et al. (1965) relataram a produção do antimicrobiano pirrolnitrina por cepas de *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. Este composto apresenta amplo espectro de ação, sendo altamente ativo contra fitopatógenos de interesse agrônômico.

3.3.1 *Burkholderia* sp.

A bactéria *Burkholderia* sp., pertencente à família Pseudomonadaceae, é comumente isolada de plantas da rizosfera, e foi descrita pela primeira vez em 1950 por Walter Burkholder que a isolou da podridão do bulbo da cebola, (GONZÁLEZ; BRICEÑO; CALDERÓN, 2009).

Burkholderia sp. é um bastonete Gram-negativo, aeróbio, possui requerimentos nutricionais simples, grande versatilidade metabólica, temperatura ótima de crescimento de 37 °C, mas pode crescer também à 42 °C. Apresenta reação de catalase e oxidase geralmente positiva.

Esse micro-organismo possui uma complexa taxonomia, sendo classificado em nove genomovares (PARKE; GURIAN-SHERMAM, 2001):

- *B. cepacia* (genomovar I)
- *B. multivorans* (genomovar II)
- *B. cepacia* (genomovar III)
- *B. stabilis* (genomovar IV)
- *B. vietnamiensis* (genomovar V)
- *B. cepacia* (genomovar VI)
- *B. ambifaria* (genomovar VII)
- *B. anthina* (genomovar VIII)

- *B. pyrrocinia* (genomovar IX)

B. cepacia tem sido bastante estudada devido ao alto potencial de controle biológico contra fitopatógenos. Esta atividade inibitória é atribuída a produção dos metabólitos secundários como cepacina, pirrolnitrina e altericidina (GONZÁLEZ et al., 2009).

Parker et al. (1984) relataram a primeira descrição da atividade antibiótica em *B. cepacia*, na qual descobriram que a cepacina A apresentava atividade contra *Staphylococcus sp.*, mas foi pouco eficiente contra *Streptococcus sp.* e a maioria dos Gram-negativos. Já a cepacina B apresentou atividade para micro-organismos Gram-negativos.

El- Banna e Winkelmann (1997) isolaram de *B. cepacia*, um composto denominado de pirrolnitrina que apresentou atividade inibitória contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias Gram-positivas, como por exemplo *Streptomyces*. Este composto possui efeito inibitório do sistema transportador de elétrons em mitocôndrias isoladas da *Neurospora Crassa* (EL – BANNA, 1998; WINKELMANN, 1998).

Cepacidina A foi um outro composto isolado de *B. cepacia* que apresentou atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*. Este composto foi classificado como um glicopeptídeo formado pela mistura de: cepacidina A₁ e cepacidina A₂ (LEE et al., 1994).

3.4 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acilhidrolase, E.C 3.1.1.3) são definidas como carboxilesterases que catalisam reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (Figura 5) de acilglicerídeos com cadeias com mais de dez átomos de carbono, agindo na interface óleo-água (BORKAR et al., 2009). Essas reações geralmente são processadas com alta regio/enantioseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalisadores (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012). Estas hidrolases

têm sido extensivamente utilizadas nas sínteses orgânicas e mais de 20 % das biotransformações são realizadas com lipases.

Baseado na estrutura tridimensional das lipases, estas são classificadas como serina hidrolases pois o sítio ativo da enzima é composto pela tríade catalítica Ser-Asp (Glu)-His similar a serina proteases (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

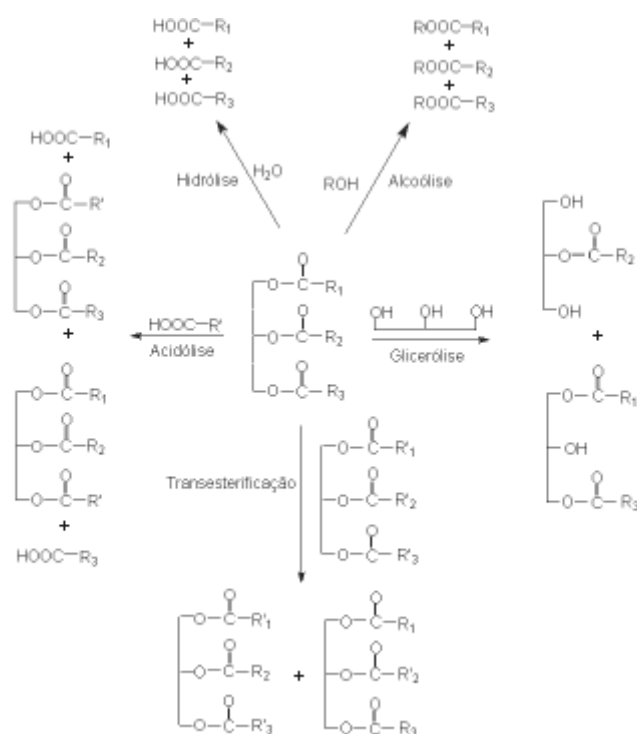


Figura 5- Reações de biotransformações de lipídios. Adaptada de Vulfson, (1994)

As lipases catalisam a hidrólise da ligação éster do triacilglicerol produzindo glicerol e ácidos graxos livres, na presença de água representada na figura 6. Através da hidrólise parcial dos triacilglicerídeos obtêm-se flavorizantes utilizados em alimentos de animais e humanos (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

cadeias maiores que 10 carbonos seguida pela detecção espectrofotométrica em 410 nm (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

As lipases destacam-se entre as hidrolases devidos as suas variadas aplicações, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos), cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (JAEGER; REETZ, 1998; HOUDE et al., 2004; HASAN et al., 2006).

Lipases também podem ser utilizadas como agentes terapêuticos, no tratamento de insuficiência pancreática, cuja suplementação é feita com pancreatina (extraída de pâncreas suíno ou bovino), entretanto são inativadas devido à sua instabilidade em pH inferior a 4 e hidrólise proteolítica. Uma alternativa terapêutica seria a utilização de lipases microbianas que são estáveis e ativas em pH ácido e resistentes à hidrólise por proteases digestivas (MESSIAS et al., 2011).

As enzimas lipases também têm sido utilizadas nas indústrias alimentícias, na obtenção de ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico e o ácido α -linolênico, além de serem aditivos de alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

3.4.1 Lipases microbianas

A maioria das lipases microbianas são enzimas extracelulares, produzidas dentro da célula e exportada para a superfície celular ou ambiente externo. Estas enzimas geralmente apresentam pH ótimo neutro ou alcalino, são termoestáveis (CHAUHAN, 2013; CHAUHAN, 2013; GARLAPATI, 2013) e podem ser produzidas por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos). Nos animais, estas enzimas participam do metabolismo de lipídios, como a digestão, a reconstituição de

gorduras e no metabolismo de lipoproteínas, já nas plantas são encontradas em tecidos de reserva de energia (MARTINS et al., 2008).

Muitos micro-organismos têm sido objetos de estudos devido a capacidade de produção de lipases que possuem ampla aplicação industrial (MASSADEH et al., 2012). As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens tanto industrialmente como economicamente, devido à estabilidade, seletividade, ampla especificidade de substrato, atividades catalíticas variadas, capacidade de alta produção em curto período de tempo e possibilidade de manipulação genética (CHAUHAN, 2013; CHAUHAN, 2013; GARLAPATI, 2013).

Lipases produzidas por várias espécies do gênero *Pseudomonas* têm sido utilizadas industrialmente em reações orgânicas e de produção de detergentes. Estas lipases também têm sido bastante utilizadas na síntese de biopolímeros, biodiesel, na produção de medicamentos como anti-inflamatórios, compostos químicos, flavorizantes e aromatizantes (BORKAR et al., 2009).

Dentre as bactérias produtoras de lipases podemos citar os seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (ANDUALEMA, 2012; GESSESSE, 2012).

Burkholderia sp. têm sido descrita como produtora de lipases alcalinas e têm sido amplamente aplicadas na biodegradação de poluentes ambientais. Essas lipases são utilizadas como aditivo de formulações de detergentes e apresentam melhor estabilidade a agentes oxidantes e detergentes comerciais em relação as lipases comerciais (RATHI et al., 2001).

O uso de lipases na indústria farmacêutica vem crescendo nos últimos anos, consideravelmente. Lactonas isoladas de *Streptomyces* apresentam atividade citotóxica contra células de melanoma e tumor de cólon. Outras lactonas isoladas de *Penicillium*, apresentam efeito inibitório sobre a síntese de colesterol (LONGO JÚNIOR; BOMBONATO; FERRAZ, 2007).

4. CONCLUSÃO

Os resultados da caracterização bioquímica da substância antifúngica produzida por *Burkholderia* sp cepa RV7S3 sugere uma atividade de lipase a qual é termoestável, e apresenta um pH ótimo de 4,5.

A substância apresentou atividade antifúngica tanto em células planctônicas quanto no biofilme de *C. glabrata*, em concentrações que não causam hemólise de sangue de carneiro.

Em conjunto esses resultados sugerem o potencial desta provável hidrolase como agente antifúngico.

REFERÊNCIAS

ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: Review. **Biotechnolog.**, v. 11, p. 100-118, 2012

BACHIEGA, G.L.; VILEGAS, W.; UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, p. 29-37, 2005.

BAKER, K. S. et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 376-385, 2004.

BIDARTH, T. Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales - Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. **Revista Chilena Infectología**, v. 21, p. 13-19, 2004.

BORKAR, P.S.; BODADE, R.G.; RAO, S.R.; KHOBRADE, C.N. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* srt 9. **Journal of Microbiology**, v.40, p. 358-366, 2008.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n.4, p. 405-15, 2003.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27(1), p. 146-156, 2004.

CASTRO, T.L.; Mecanismos de Resistência da *Candida SP* Antifúngicos. **Infarma.**, v.18, p. 30-35, 2006.

CASTRO,R.D.; LIMA, E.O. Atividade Antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptu s globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP.**, v. 39, p. 179-184, 2010.

CLAUDINO, A.L. **Dissertação de Mestrado:** Caracterização de Isolados de *Candida spp* de Cavidade Bucal Quanto aos Aspectos fenotípicos e Moleculares e Obtenção de Mutantes Heteroresistentes à Anfotericina B e Fluconazol . **Universidade Federal de Alfenas**, 2007.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust.**, v. 187, p. 404-409, 2007.

CRUCIANI, M.; SERPELLONI, G. Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 9, p.175-191, 2008.

DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Elsevier.**, v.18, p.26-31, 2000.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVUM, A. An antifungal compound : 4' phenyl-1-naphthyl –phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB 16. **Medicine and Biology.**, v. 15, n.1, p. 7-12, 2008.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G. Genome evolution in yeasts. **Nature.**, v. 430, p. 35-44, 2004.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

EL-BANNA; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology** v. 85, p. 69-78. 1998.

ESPINEL- INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal: diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p 15-22, 2009.

FERNÁNDEZ, C. A. M.; URÍA, J. C.; ARENAS, R. C.; PURURERA, J. M.; IRIBAR, W.T. Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. **Acta Medica**, v. 8, p. 80-85, 1998.

FIDEL, P.L.; VAZQUEZ, J.A, SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol*, v. 12, p. 80-90, 1999.

GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K, H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, p. 265-82, 1990.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São paulo, vol 33, 2010.

GUINEA, J.; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M.; CUEVAS, O.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of effluxpumps. **Med Mycol.**, v. 44, p.575-578, 2006.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology an Infection.**, 2013.

GONZÁLEZ, E.P.; BRICEÑO, S.C.; CALDERÓN, Y.A. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz de amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. **Revista de la Sociedade Venezolana de Microbiologia**, v. 29, p 103-109, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HAZEN, K. C. **New and emerging yeast pathogens**. *Clinical Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HII, I-M et al. Changing epidemiology of candidemia in a medical center in a medical center in middle Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection.**, p 1-10, 2013.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 118, p. 155-170, 2004.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.

KOBLITZ, M.G.B.; PASTORE, G.M. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. **Cien. Agrotec.**, v. 30, p.494- 502, 2006.

KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. **Curr Opin Investing Drugs.**, v.5; p. 186- 197, 2004.

LEE, C.H. et al. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. **J. Antibiotics**. v. 47, p.1402-1405, 1994.

LIGON, J.M et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science.**, v. 56, p. 688- 695, 2000.

LIMA, I.O., et al., Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.197,197-20, 2006.

LONGO JÚNIOR, L. S.; BOMBONATO, F. I.; FERRAZ, H. M. C. Métodos de preparação de lactonas de anel médio. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 415-424, 2007.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases – An overview. **Analytical Chemistry Insights**, Auckland, v. 3, p. 9-19, 2008.

MARR, K. A.; LYONS, C. N.; HA, K.; RUSTAD, T. R.; WHITE, T. C. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans* . **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45 p. 52-59, 2001.

MARICHAL, P. et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 a-demethylase (ERG11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 2701-2713, 1999.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31(8), p. 1942-1947, 2008.

MASSADEH, M.; SABRA, F.; DAJANI, R.; ARAFAT, A. Purification of lipase enzyme produced bt *Bacillus Stearothermophilus* hu1. **International Conference on Eco-systems and Biological sciences**, v.19-20, p. 34-37, 2012.

MESSIAS, J.M. et al. Lipases Microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas.**, v.32, p. 213-234, 2011.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 1856-1861, 1999.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi.

Fungal Genetics and Biology, v.47, p. 94-106, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125–131, 2011.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Ann. Rev. Phytopathol.** v. 39, p. 225-258, 2001

PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L.; SEINER, V.; TREJO, W.H.; PRINCIPE, P.A.; SYKES, R.B. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 431-440, 1984.

PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, 2007.

PFALLER et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance[®]) registry, 2004-2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.74, p. 323-331, 2012.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 1-8, 1988.

SANGLARD, D.; Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.39, p.2378- 2386, 1995.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SINGH, N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, p. 1–7, 2001.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Curr Microbiol.**, v. 61, p 534–540, 2010.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol.**, v. 47, p.681–689, 2009.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. JR. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 244-251, 2006.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leuvenhaeck.**, v.81, p. 537-547, 2002.

RANG et al., **Farmacologia.**, 6^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAJENDRAN, R.; ROBERTSON, D.P.; HODGE, P.J.; LAPPIN, D.F.; RAMAGE G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. **Mycopathologia.**, v. 170, p.229–235, 2010.

RATHI, P.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry.**, v. 37, p. 187-192, 2001.

REX, J.H.; WALSH, T. J, SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E.; EDWARDS, J. E. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p. 662-678, 2000.

REVANCAR, S. G. et al. Cloning at characterization of the lanosterol 14a-demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 324, p. 719-728, 2004.

RODERO, L. et al. G484S amino acid substitution in 14-a lanosterol demethylase (ERG11) is related to fluconazol resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11 p. 3653-3656, 2003.

RODRIGUES, C.F; SILVA, S. HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 2013.

RODLOFF, A.; KOCH, D.; SCHAUMANN, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European Journal of Medical Research.**, v.16, p.187-195. 2011.

SHOJI, J. et al. Isolation of cepafunginas I, II, and III from *Pseudomonas* species. **The Journal of Antibiotics.** v. 43, p. 784-787. 1989

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia.** 5^a ed.. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 15-32, 2003.

VULFSON, E.N. Em Lipases: Their Structure, Biochemistry and application. **Cambridge University Press: Great Britain**, p 271, 1994.

WINGETER, M.A. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas de cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, p. 272-276, 2007.

ZAITS, C. et al. **Compêndio de micologia médica: cryptococose e outras leveduras**. Rio de Janeiro: Medica e Cientifica, 1998. p. 297-303.

ZER, Y.; BALCI, I.; MECIC, G. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from intensive care unit patients. **New Microbiol.** v. 25, n. 4, p. 489-494, 2002.

YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 267-272, 2003.

Artigo

Substâncias bioativas produzidas por *Burkholderia* sp. com ação antifúngica em *Candida* spp.

Flávia Soares Lassie¹, Marilúcia Santos Ludovico¹, Marta Viviana Torres Cely¹, Alexandre Tadachi Morey², Luana Delgado Munhoz¹, Juliana Fontequê Pistori¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Sueli Fumie Yamada Ogatta², Lucy Megumi Yamauchi Lioni², Geni da Silva Varéa³, Robert Alvin Bernedo Navarro⁴, Tomomasa Yano⁴, Galdino Andrade^{1a}

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

²Departamento de Microbiologia, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

³Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Microrganismos Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

⁴Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862

^aCorresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil

Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andrade@uel.br

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são comensais colonizando o trato gastro intestinal e genital. Estes micro-organismos são oportunistas e responsáveis por 15% dos casos de infecções adquiridas nos hospitais, sendo assim um patógeno de importância clínica. Nos últimos anos têm ocorrido modificações na epidemiologia destas infecções, com um aumento no número de casos de espécies não *albicans* em infecções invasivas. A emergência de infecções fúngicas e a ocorrência de resistência intrínseca e adquirida têm refletido no aumento da busca por novos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica das substâncias extracelulares produzidas pela cepa RV7S3 (*Burkholderia* sp.) para o controle de leveduras do gênero *Candida*. Foram realizadas a identificação e a caracterização bioquímica da substância. Avaliou-se a atividade antifúngica através de testes de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM), e o efeito da ação desta substância sobre a formação de biofilme. A atividade hemolítica também foi avaliada. Os dados sugerem que a provável substância antifúngica apresenta atividade de uma lipase, uma enzima da classe das hidrolases. A menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento fúngico foi de $0,38 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pelo teste de difusão em ágar observou-se formação de halos de inibição do crescimento fúngico com diâmetro igual ou superior a 10 mm, apresentando $17,5 \pm 0,5$ mm. Este produto apresentou baixa atividade hemolítica. A substância antifúngica provocou a redução da viabilidade celular do biofilme. A atividade antifúngica, baixa atividade hemolítica sugerem o potencial desta provável hidrolase como agente antifúngico, entretanto novos estudos farmacológicos e bioquímicos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras Chave: Leveduras; Produção de antimicrobiano; Lipase, Antifúngicos.

ABSTRACT

Candida species are commensal colonizing the gastrointestinal and genital tract. These micro-organisms are opportunistic and caused around 15% of infections cases acquired in a hospitals, and it is a pathogen of clinical importance. In recent years was observed some changes in the epidemiology of these infections, increasing the number of cases of non-*albicans* which species causing invasive infections. The emergence of fungal infections and the occurrence of intrinsic and acquired resistance are reflecting the increased interest to search new antimicrobials. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of extracellular polypeptides produced by strain RV7S3 (*Burkholderia* sp.) to control a *Candida* spp. The identification and biochemical characterization of the substance and the antifungal activity were carried out as agar diffusion as a minimum inhibitory concentration (MIC). The cytotoxicity and hemolysis tests were also evaluated. The results suggest that the antifungal substance is likely a lipase, an enzyme of the hydrolase class. The protein showed a MIC with 038 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the diffusion in agar the inhibition zone formed halo with 17.5 ± 0.5 mm diameter. The cytotoxicity and hemolysis tests were low. The antifungal substance decreased the cell viability of the biofilm. The antifungal activity plus a low cytotoxicity and hemolytic activity shows a great potential of this polypeptide will be an antifungal agent, however a new pharmacological and biochemical studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: Yeast; Production of antimicrobial; Lipase; Antifungal

1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* podem causar diversos processos infecciosos em humanos os quais variam de acordo com as relações entre o hospedeiro e a microbiota. Estes micro-organismos são comensais, porém em determinados indivíduos e situações específicas podem tornar-se patogênicos, sendo responsáveis desde infecções fúngicas superficiais a infecções sistêmicas (SILVA et al., 2012). Os fatores de risco que contribuem para essas infecções são utilização de antibacterianos de amplo espectro, corticosteroides, quimioterapia, diálise e uso prolongado de cateteres (PFALLER et al., 2012).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde em diferentes sítios anatômicos. Esta espécie é comumente isolada do trato urinário, responsável por 70% dos casos clínicos, seguido por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dublinienses*. No Brasil a prevalência dos isolados em urina é de 35 a 70% para *C. albicans*, 5 a 52% para *C. tropicalis* e de 7 a 9% para *C. glabrata* (RODRIGUES, MEZZARI, FUENTEFRIA, 2011).

A frequência de infecção da corrente sanguínea por *Candida* sp. tem aumentado em todo o mundo, porém este episódio é mais notável na América do Norte, no qual estes fungos constituem-se na quarta causa mais comum desta enfermidade nos hospitais terciários. *C. albicans* é agente mais comum, seguido por *C. glabrata* (PFALLER et al., 2012).

O tratamento das candidíases é difícil devido ao número limitado de agentes antifúngicos disponíveis e a facilidade com que estes micro-organismos adquirem resistência a esses fármacos. Antifúngicos poliênicos e azóis constituem o principal recurso terapêutico no tratamento de candidíase, porém espécies não *albicans* como *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam naturalmente sensibilidade reduzida ao fluconazol (FRANÇA, RIBEIRO, QUEIROZ-TELLES, 2008).

Para reduzir o problema da resistência algumas medidas devem ser utilizadas, como o controle do uso desses fármacos, pesquisas sobre o funcionamento dos mecanismos genéticos de resistência e sobre os

alvos potenciais para o desenvolvimento de novos antifúngicos, oferecendo assim, um tratamento apropriado e eficiente com maior especificidade (NASCIMENTO et al., 2000).

Sabe-se que os solos abrigam grande diversidade de espécies microbianas fundamentais ao funcionamento deste ecossistema. Neste contexto, as bactérias são fontes importantes de novos fármacos e outros metabólitos de interesse industrial (ZHANG, 2008; XU, 2008).

Bactérias antagonistas são possíveis fontes de pesquisa para novos fármacos com atividade antimicrobiana, já que os metabólitos que produzem podem inibir o crescimento de outras bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (CAIN et al., 2000). É fundamental a expansão dessa área de pesquisa de produtos naturais e um aumento nos incentivos econômicos para pesquisas acadêmicas, atraindo o investimento de indústrias farmacêuticas (MOSSIALOS et al. 2010; WHO, 2011). O Laboratório de Ecologia Microbiana trabalha na pesquisa de micro-organismos produtores de compostos com atividade antibiótica contra fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2011). Mais recentemente, essa atividade vem sendo testada contra patógenos de importância humana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica das substâncias extracelulares produzidas pela cepa RV7S3 (*Burkholderia* sp.) no controle de leveduras do gênero *Candida*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

2.1.1 Leveduras

Oito isolados clínicos de leveduras das espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, provenientes de pacientes portadores de diabetes, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e candidíase vaginal da coleção do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da Universidade Estadual de Londrina foram cultivados em caldo Sabouraud à

37 °C por 24 horas. Os isolados foram estocados em caldo Sabouraud contendo glicerol 40% a – 20 °C e em nitrogênio líquido.

2.1.2 Bactéria produtora de antifúngico

A bactéria antagonista do gênero *Burkholderia* (cepa RV7S3), produtora das substâncias antifúngicas, foi isolada a partir de amostras de solo da rizosfera de gramínea. A identificação do gênero foi realizada a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA. A bactéria foi armazenada em caldo nutriente contendo glicerol 40% a – 20 °C e em nitrogênio líquido. A atividade antifúngica da cepa de *Burkholderia* RV7S3 foi inicialmente avaliada contra os oito isolados clínicos de *Candida* spp. O teste de antagonismo foi realizado em ágar Sabouraud. Na placa de Petri a cepa RV7S3 foi inoculada no centro do ágar nutriente adicionado de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (100 mg L^{-1}). Após o cultivo a 28 °C por 48 horas de *Burkholderia* sp., uma suspensão das leveduras em caldo Sabouraud foi vertido sobre a colônia de *Burkholderia* previamente crescida em ágar nutriente. Em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e avaliado o tamanho do halo formado ao redor da colônia de *Burkholderia*.

2.2 Obtenção de substâncias bioativas a partir de culturas de *Burkholderia* sp.

A cepa RV7S3 foi inoculada em ágar nutriente suplementado com $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e incubada por 24 h a 28 °C. A partir do segundo subcultivo as células foram ressuspendidas em solução salina esterilizada (0.85%) a uma $\text{D.O}_{590} = 0.390$ que corresponde a uma densidade celular de $1 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$. Cerca de 500 μL desta suspensão foram inoculados em 5 L de caldo nutriente com 100 mg L^{-1} de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. A cultura foi incubada a 28 °C durante 72 h, sob sistema de aeração por turbina com vazão de 170 L min^{-1} de ar atmosférico esterilizado. Após o cultivo, as células foram separadas do meio líquido por centrifugação ($9,000 \text{ rpm } 20 \text{ min}^{-1}$, 4 °C) e descartadas.

O sobrenadante livre de células foi concentrado em rotaevaporador (Büchi® R 215) a 10% do volume e em seguida filtrado em algodão. Após foi realizada uma partição líquido-líquido na razão 1:2 (v/v) em alíquotas de 100 mL em funil de separação com acetato de etila. A fase aquosa

da partição foi fracionada e precipitada com sulfato de amônio (Sigma) a 20%. O sedimento foi ressuspenso em volume mínimo de tampão fosfato- NaCl 0,85 % (PBS) pH 7.4, colocado em um membrana e dialisado em água-deionizada a 4 °C por 24 horas.

Um volume de 10 mL do extrato precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, filtrado com membrana de 0.45 µm (Milipore®) e aplicados em coluna SUPERDEX 75 10/ 300 GL GE. As condições de corrida utilizadas foram: fluxo de 0.5 mL min⁻¹ e pressão de 1.5 MPa. As frações coletadas foram liofilizadas e o precipitado ressuspendido em 1 mL de PBS pH 7.4, e testadas quanto a atividade biológica contra *Candida* spp.

Os extratos bruto e parcialmente purificados foram esterilizados por filtração utilizando-se membranas de acetato celulose 0,22 µm (Millipore®).

Para a determinação da concentração proteica dos extratos enzimáticos obtidos (bruto e parcialmente purificado) foi utilizada a técnica descrita por Bradford (1976), tendo como padrão albumina de soro bovino.

2.3 Análise de polipeptídeo em gel de poliacrilamida

As amostras obtidas do sobrenadante e da precipitação com sulfato de amônio foram designadas respectivamente de extrato bruto e parcialmente purificadas e foram analisadas após eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) ou não.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS PAGE 12%) ou não (PAGE 10%) foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese os géis foram corados em solução de prata (Blum et al., 1987).

2.4 Avaliação da atividade antifúngica através de difusão em ágar e concentração inibitória mínima

A cepa de *C. glabrata* (db 59), foi utilizada como cepa controle na verificação da qualidade do antibiótico produzido após o cultivo da cepa

RV7S3, por ter apresentado alta sensibilidade ao polipeptídeo com atividade antifúngica no teste de antagonismo direto.

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método de difusão em ágar. Inicialmente as leveduras (a partir do estoque criopreservado) foram cultivadas em ágar Sabouraud por 24h a 37 °C. As células foram ressuspensas em NaCl 0,85% (p/v) até obter uma suspensão celular de 10^6 células mL^{-1} , estimada por contagem direta das células em Câmara de Neubauer. As células foram inoculadas em ágar Sabouraud (AS) (Fluka[®]) pela técnica de pour plate. Poços de 9 mm de diâmetro equidistantes foram realizados no meio, e nestes foram adicionados 150 μL do sobrenadante bruto esterilizado. Como controle foi adicionado somente caldo nutriente (CN) acrescido com $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. As placas foram incubadas por 24 h 37 °C e feita a leitura da medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento (mm). Todos os testes foram realizados em duplicata.

2.2.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Após a análise da difusão em ágar, *Candida glabrata* foi utilizada nos ensaios posteriores.

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em microplacas com 96 poços, de acordo com o proposto pelo CLSI, (2008) com modificações. O inóculo foi preparado a partir de cultura de *C. glabrata* (db 59) e *C. tropicalis* cultivadas em AS por 24 horas a 37 °C. Foi adicionado 100 μL de cada inóculo nos seus respectivos poços na placa, contendo a substância antifúngica na concentração que variou de 3,04 a 0,0112 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Fluconazol (Pharmascience[®]) de 0.125 a 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi utilizado como controle. Foram realizados controle de esterilidade do meio de cultivo, de crescimento do inóculo e esterilidade da substância antifúngica. As microplacas foram incubadas por 24 h 37 °C e observado o crescimento celular. Este foi revelado com a adição de 10 μL de uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC) 1% e incubado por 20 min. à 37 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata.

2.3 Caracterização bioquímica das substâncias bioativas com ação antifúngica

2.3.1 Determinação da atividade lipolítica do polipeptídeo bioativo

Uma mistura reativa foi preparada com 1 mL de solução de palmitato de ρ - nitrophenila (ρ NPP) em isopropanol a 3 mg mL^{-1} e dissolvidos em 10 mL de uma solução de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.5 contendo 2 g de Triton X-100. A mistura foi homogeneizada em temperatura ambiente até a completa dissolução do substrato. Uma alíquota de 0.3 mL de extrato enzimático diluído 1:10 foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e adicionada de 0.7 mL de mistura reativa, permanecendo nas condições de ensaio por 3 minutos. Ao branco foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.5; no controle do teste foram adicionados 0.7 mL de tampão e 0.3 mL de extrato enzimático; no controle de substrato foram adicionados 0.3 mL de tampão e 0.7 mL de mistura reativa. A hidrólise do substrato palmitato de ρ -nitrophenila (ρ NPP) pela lipase em meio aquoso gera a liberação da substância cromogênica ρ - nitrofenol que foi definida como a liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de ρ -nitrofenol por minuto de reação, por mL do extrato enzimático nas condições da reação.

2.3.2 Avaliação de atividade lipolítica através da técnica de zimografia

O zimograma foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Castro-Ochoa et al (2005) como modificações. Foram preparados 30 mL de meio de cultura para atividade lipolítica (ágar bacteriológico 15 g ; óleo de oliva 2% (m/v) ; Tween 80 0.001 g e rodamina B 0.001 %, 1000 mL de H_2O) vertidos sobre a placa de Petri e o gel nativo da eletroforese contendo o material precipitado foi depositado sobre o meio. As placas foram incubadas a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18h. A atividade lipolítica foi determinada através da formação de halo revelado pela exposição à luz UV-A 365nm.

2.3.3 Efeito do pH na estabilidade das substâncias bioativas

Alíquota de 1 mL do extrato precipitado foi tratado com 2 mL das seguintes soluções tampão acetado de sódio pH= 3.6; 4.0; 4.5; 5.0 e 5.6 ; tampão fosfato de sódio: pH= 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 e 8.0 e tampão Tris-HCl: pH= 8.5 e 9.0 e incubado a 25 °C por 24 horas a 120 rpm. Após este período foi determinada a atividade enzimática segundo metodologia descrita no item 2.3.1. Concomitantemente realizou-se o teste de atividade biológica através do método de difusão descrito no item 2.2.6, utilizando-se das mesmas soluções tampão.

2.3.4 Termoestabilidade

Alíquotas do extrato precipitado foram mantidas em diferentes condições de temperatura, aquecidas em banho maria à 37, 70, 80, 110 e 120 °C por 30 minutos e resfriadas à - 20 °C e 4 °C por 24 h. A atividade antifúngica foi analisada através do método de difusão em ágar como descrito anteriormente.

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias bioativas

Durante o processo de purificação as frações obtidas foram avaliadas através de testes realizados em microplacas com 96 poços de microdiluição em caldo. O inóculo foi preparado a partir de colônias de *C. glabrata* (db) 59 cultivadas em ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C.

2.5 Detecção de atividade hemolítica do extrato precipitado

A atividade hemolítica foi verificada em placas de 96 cavidades com fundo em "U", seguindo técnica descrita por Bohach et al (1988). Hemácias de carneiro foram lavadas três vezes com PBS 0.05 M pH 7.2 de uma concentração de 1% (v/v). Cerca de 50 µL da suspensão de hemácias foi adicionado em cada poço teste da placa. O extrato precipitado foi adicionado

em concentrações que variaram de 3,04 – 0,0112 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle positivo de hemólise foi utilizado água destilada e como controle negativo PBS. A placa foi incubada em estufa BOD a 37 °C por 1 h, e após este período levadas à geladeira (4 °C) por 12 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.6 Atividade antifúngica do extrato precipitado sobre a formação de biofilme de *Candida glabrata*

A atividade antifúngica do extrato precipitado sobre a viabilidade celular do biofilme foi analisada através do método de XTT (2,3- Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) e de microscopia por fluorescência através de LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit.

O método de XTT foi realizado em microplacas de 96 poços. *C. glabrata* foi cultivada em ágar Sabouraud a 37 °C por 18 h, após o período de incubação ajustou-se a densidade celular a uma $D_{520\text{nm}} = 0.380$. Uma alíquota de 100 μL da suspensão celular foi adicionada a cada poço da placa, e a mesma foi incubada a 37 °C por 1.5 h a 75 rpm, após esse período, o conteúdo dos poços foi aspirado e os poços lavados uma vez com PBS. Adicionou-se 150 μL de RPMI 1640 em cada poço e em seguida foi incubado a 37 °C por 24 h a 75 rpm. Após incubação, os poços foram lavados uma vez com PBS esterilizado e foi adicionado o extrato precipitado nas concentrações de 30.4 a 0.059 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em duplicata e incubados a 37 °C por 48 h. Foi considerado controle positivo uma suspensão de células sem substância antifúngica. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Asys HiTech UVM 340), $\lambda = 490 \text{ nm}$.

A microscopia de fluorescência para análise da viabilidade do biofilme foi realizada em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. O inóculo e o preparo do biofilme foi o mesmo utilizado pelo método de XTT. Alíquota de extrato precipitado na concentração de 7.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi adicionada em duplicata. Ao biofilme formado e tratado, os procedimentos utilizados para a coloração das lamínulas por fluorescência foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lipases são encontradas em diversos organismos, incluindo plantas, animais, fungos e bactérias, entretanto a principal fonte para aplicação industrial são os micro-organismos dentre estes destaca bactérias do gênero *Burkholderia* (Padilha, 2010).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, catalisam a hidrólise de longas cadeias de acilgliceróis, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono formando ácidos graxos e glicerol, agindo na interface óleo/água (CHIA-FENG et al., 2012; MESSIAS et al., 2011).

Estas têm sido utilizadas extensivamente em diversos processos como na composição de detergentes, aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas, no tratamento de efluentes, nas indústrias têxteis, cosmética, e outras aplicações. Na indústria farmacêutica têm sido utilizadas na síntese de intermediários de medicamentos anti-inflamatórios. As aplicações de lipases variam conforme o tipo de reação catalisada, por exemplo, em reações de transesterificação são utilizadas para converter óleos em biodiesel (CHIA-FENG et al., 2012).

As lipases são utilizadas pelos micro-organismos como mecanismo de defesa, devido sua ação fosfolipídica, quando secretadas proporcionam competição com a microbiota, facilitam a digestão de lipídios e ácidos graxos livres liberados auxiliando na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (MESSIAS, et al., 2011).

A partir da precipitação com 20% de sulfato de amônio foi produzido 0.45 g L^{-1} de substância bioativa parcialmente purificada para cada 10 L de sobrenadante. O extrato proteico antifúngico apresentou atividade lipolítica de 820 UI/ mL. Na avaliação qualitativa da atividade de lipase por meio da irradiação de luz ultravioleta dos meios de cultura contendo o corante rodamina B foi observado a presença de fluorescência do composto formado entre os ácidos graxos livres no meio e o corante.

A produção de lipases por *Burkholderia* sp. também foi descrita por outros autores. Chia-Feng et al. (2012) observaram que cepas de

Burkholderia sp. produziram lipases e apresentaram menor atividade quando comparado com o nosso resultado (com 45.8 Ull/mL e 122.3 Ull/mL mas em meios de cultura e tempo de cultivo diferentes). Por outro lado, Zhengyu et al. (2009) relataram a produção de lipases por *B. cepacia* mas identificaram a atividade através da hidrólise do óleo de oliva no teste de placa contendo o corante Rodamina B.

O extrato enzimático foi mais ativo entre o pH de 4.0 a 4.5 (Figura 1) mas as lipases bacterianas geralmente apresentam carácter neutro ou básico, porém algumas espécies de *Pseudomonas* apresentam pH ótimo de 4.8 (Gupta et al., 2004), similar ao pH ótimo do polipeptídeo analisado neste estudo.

O pH altera a estabilidade da enzima pois modificações no pH alteram o carácter iônico dos grupos aminos e carboxílicos da proteína, afetando o sítio catalítico e conformação da enzima. Estas mudanças conformacionais influenciam na interação enzima-substrato afetando a estabilidade da enzima (GUPTA et al, 2004).

A substância antifúngica se mostrou termoestável apresentando maior atividade biológica a 37 °C e 70 °C, entretanto ainda se manteve ativa nas outras temperaturas testadas, porém com menor atividade. (Figura 2). A estabilidade térmica é um requisito importante para a comercialização de lipases, sendo que geralmente apresentam temperatura ótima entre 30-60 °C (Gupta et al., 2004).

Dependendo da fonte, a atividade de lipase se mantém em temperatura entre ambiente e 70 °C, mas com atividade ótima na faixa entre 30 a 40 °C, variando sua termoestabilidade em função da origem. As lipases microbianas são as de melhor estabilidade térmica (CASTRO et al., 2004).

Foram detectadas três frações ativas na cromatografia de exclusão molecular (Figura 3), as frações que apresentaram atividade biológica foram identificadas e fracionadas (Figura 4). A metodologia usada foi eficiente e de baixo custo.

A massa molecular da substância semi-purificada foi estimada entre 26- 37 kDa. Padilha (2010) detectou lipases com massa molecular variando entre 20 e 75 kDa, em *Burkholderia cepacia*.

Foram observados para o extrato bruto e extrato precipitado respectivamente para *C. glabrata* halos de inibição de 17.5 ± 0.5 mm e 19 ± 1 mm.

A CIM da substância antifúngica foi realizada para as cepas *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A CIM foi de $0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as cepas, e $\leq 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o fluconazol utilizado como controle.

Espécies de *Candida* não *albicans* apresentam valores maiores de CIM para o azóis do que *C. albicans* (Godoy et al. 2003) em hospitais da América Latina. Isolados de *C. glabrata* frente ao fluconazol apresentaram valores para CIM₅₀ e CIM₉₀ de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Atividade antifúngica de substâncias obtidas de bactérias também foi descrita por Spadari (2013). Em seu trabalho o autor descreveu a atividade de substância bioativa produzida por actinomicetos em *Candida* e dermatófitos, apresentando halo de inibição de 8.75 mm

Quanto ao teste de hemólise do sobrenadante e do extrato enzimático precipitado com sulfato de amônio (20%) apenas as concentrações 3.04 e 1.52 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade hemolítica (Tabela 1).

A substância antifúngica na concentração de $7.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (12.5%) se mostrou ativa contra células do biofilme de *C. glabrata* evidenciando a redução da viabilidade celular quando comparada ao controle positivo da reação sem extrato precipitado (Figura 5), quando comparadas as imagens do controle positivo com o biofilme tratado (Figura 6).

4. CONCLUSÃO

Os resultados da caracterização bioquímica da substância antifúngica produzida por *Burkholderia* sp cepa RV7S3 sugere uma atividade de lipase a qual é termoestável, e apresenta um pH ótimo entre 4.0 e 4.5.

A substância apresentou atividade antifúngica tanto em células planctônicas quanto no biofilme de *C. glabrata*, em concentrações que não causam hemólise de sangue de carneiro.

Em conjunto esses resultados sugerem o potencial desta provável hidrolase como agente antifúngico.

BIBLIOGRAFIA

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plants, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. V.8, p. 93-99, 1987.

BOHACH, G.A.; SNYDER, I.S. Purification of *Escherichia coli* α - hemolysin. **Methods Enzymol.** v. 165, p. 137-146.

BRADFORD, M.M.; A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72,p. 248-254, 1976.

CAIN, C.C.; HENRY, A.T.; WALDO, R.H.; CASIDA JR, L.J.; FALKINHAM, J.O. Identification and characteristics of a novel Burkholderia strain with broadspectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4139–4141, 2000

CASTRO, T.L.; Mecanismos de Resistência da *Candida SP* Antifúngicos. **Infarma.**, v.18, p. 30-35, 2006.

CASTRO,R.D.; LIMA, E.O. Atividade Antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP.**, v. 39, p. 179-184, 2010

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27(1), p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L.D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHEN, L.Y.; Associated clinical characteristics of patients with candidemia among different *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p.1-6, 2012.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust.**, v. 187, p. 404-409,2007.

CHIA-FENG, L.; CHI-YANG, Y.; I-CHING, K.; SHIOW-LING L. Optimization of Lipase Production by *Burkholderia* sp. Using Response Surface Methodology. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 14889-14897, 2012.

FRANÇA, J.C; RIBEIRO,C.E; QUEIROZ-TELLES,F; Candidemia em um Hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2008; v.41, 23-28.

GODOY,P. et al. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. **Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals**. 2003, v.98, p. 401-405, 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbial Biotechnol.**,v.64,p. 763-781, 2004

HWANG, H.T. et al. Review: Lipase- Catalyzed Process for Biodiesel Production: Protein engineering and lipase production. **Biotechnology an Bioengineering**, p.1-34, 2013.

KRCMERY, V.; KALAVSKY, E. Antifungal drug discovery, six new molecules patented after 10 years of feast: why do we need new patented drugs apart from new strategies? **Recent. Patents. Anti-Infect. Drug. Disc.**, v.2, p.182-187, 2007.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4**, v.227,p.680-685, 1970.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock – Biology of Microorganisms** 13^a ed. Pearson Prentice Hall, 2012.

MARTIN-DEL CAMPO, M.B. et al. The oxidative stress response of opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. **Revista Iberoamericana de Micología**. 2013.

MESSIAS, J.M. et al. Lipases Microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, p. 213-234, 2011.

MOSSIALOS, E. et al. Policies and incentives for promoting innovation in antibiotic research. **European Observatory on Health Systems and Policies**, 2010. Disponível em <<http://www.euro.who.int>>, acesso em 17 de outubro de 2011.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, PAULO C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol**, v. 31, p. 247-256, 2000

OLIVEIRA, R.D., MAFFEI, C.M., Martinez, R., Infecção Urinária Hospitalar por Leveduras do Gênero *Candida*. **Rev. Ass. Med. B**, p.231-235, 2001.

OLIVEIRA, S.G.D et al. Avaliação da susceptibilidade antifúngica e citotoxicidade de uma classe de flavonas. **XII ENPOS**, 2010.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125–131, 2011.

PADILHA, G.S.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Partição da lipase de *Burkholderia cepacia* em sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato., **Exacta**, v.8, p. 193-199, 2010.

PASSOS, XS et al. *Candida* colonization in intensive care unit patient's urine. **Memorial Oswaldo Cruz. Mem. Inst Oswaldo Cruz**, vol. 100, p. 925-928.

PASTORE, M.C; COSTA, V.S.R.C; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.135-140, 2003.

PFALLER et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance[®]) registry, 2004-2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**, v.74, p. 323-331, 2012.

RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A.M. Candidúria: Revisão Atual. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. 2011; 24: 142-150

SILVA, S.M.F.Q. et al. Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.17, p. 1649-1656, 2012.

SPADARI, C.D.C. Bioprospecção de uma substância antifúngica potencialmente nova produzida por actinomicetos isolados no RS. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia.** 5^a ed.. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

WALSH, T. J.; LEE, J.W.; ROILIDES, E.; PIZZO, P. A. Recent progress and current problems in management of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. **Curr. Opin.Oncol.**, v. 4, p. 647-655, 1992.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v.39, p. 309-317, 2004.

WINGETER, M.A. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas de cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2007; 40: 272-276.

World Health Organization (WHO). Race against time to develop new antibiotics. **Bulletin of the World Health Organization** 2011; 89:88–89. Disponível em <<http://www.who.int>>, acesso em 2 de novembro de 2011.

ZER, Y.; BALCI, I.; MECIC, G. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from intensive care unit patients. **New Microbiol.** v. 25, n. 4, p. 489-494, Oct. 2002.

ZHANG, L., XU, Z. Assessing Bacterial diversity in soil. **J. Soil Sediments.** V. 8, p. 379- 388, 2008.

ZHENGYU S, S et al. A rapid and efficient method for directed screening of lipase production *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. **Journal of Bioscience and Bioengineering.**, v. 107, p. 658-661, 2009.

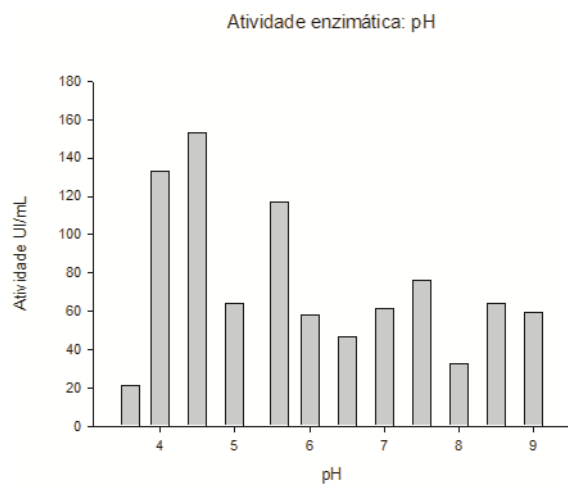


Figura 1. Efeito do pH na atividade enzimática do extrato precipitado produzido por *Burkholderia* sp.

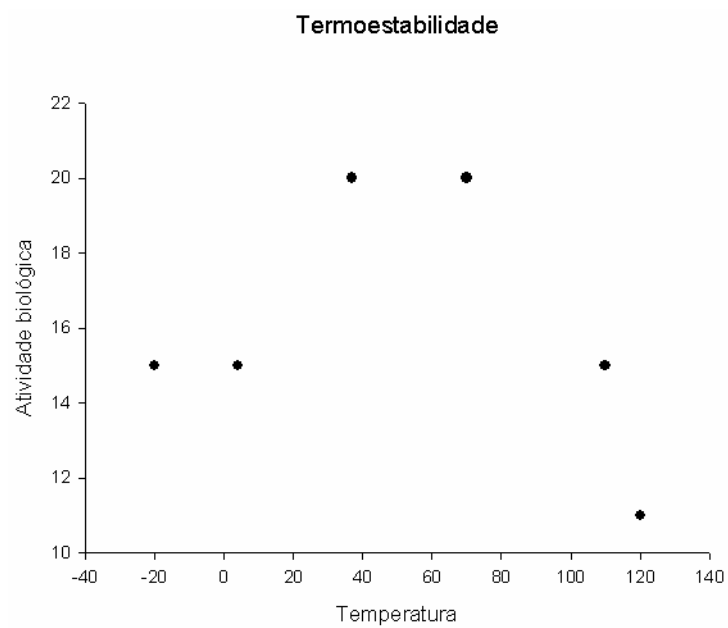


Figura 2. Ensaio de termoestabilidade do extrato proteico bruto produzido por *Burkholderia* sp.

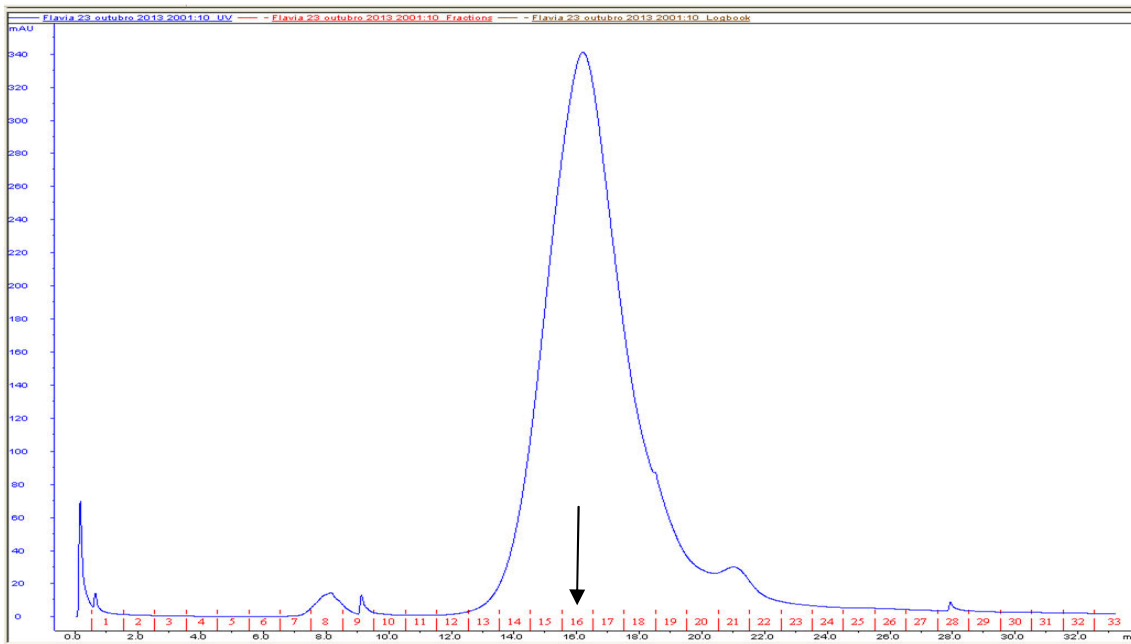


Figura 3. Perfil cromatográfico de exclusão molecular utilizando coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC e PBS pH 7.4. Frações com atividade antifúngica encontradas nos tubos, 14, 15 e 16 (1 mL por tubo) (seta indica).

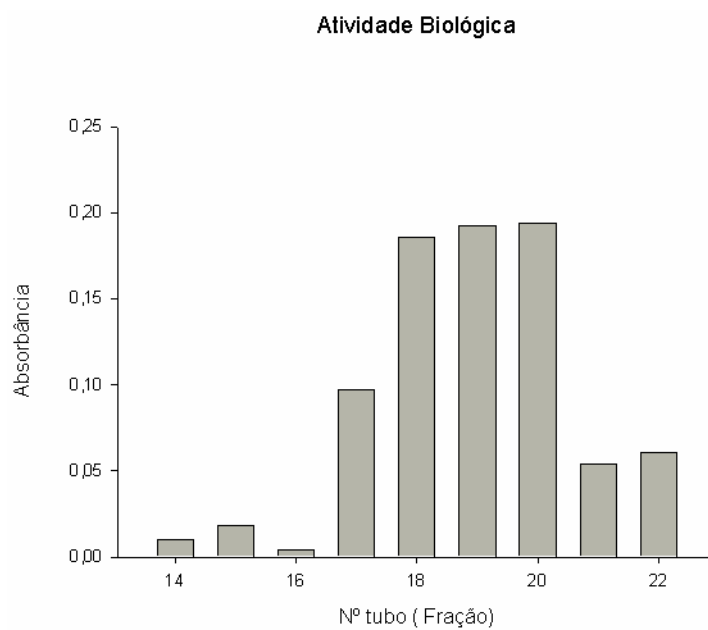
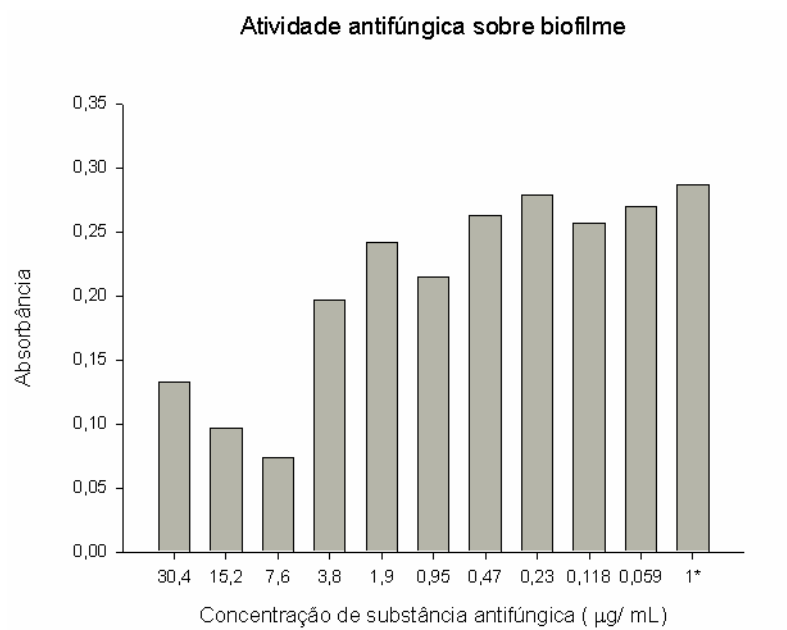


Figura 4. Atividade biológica das frações testadas com leitura em espectrofotômetro $\lambda = 530$ nm. Frações com atividade antifúngica encontradas nos tubos, 14, 15 e 16.



1* Controle de crescimento

Figura 5. Atividade antifúngica sobre formação de biofilme pelo método de XTT

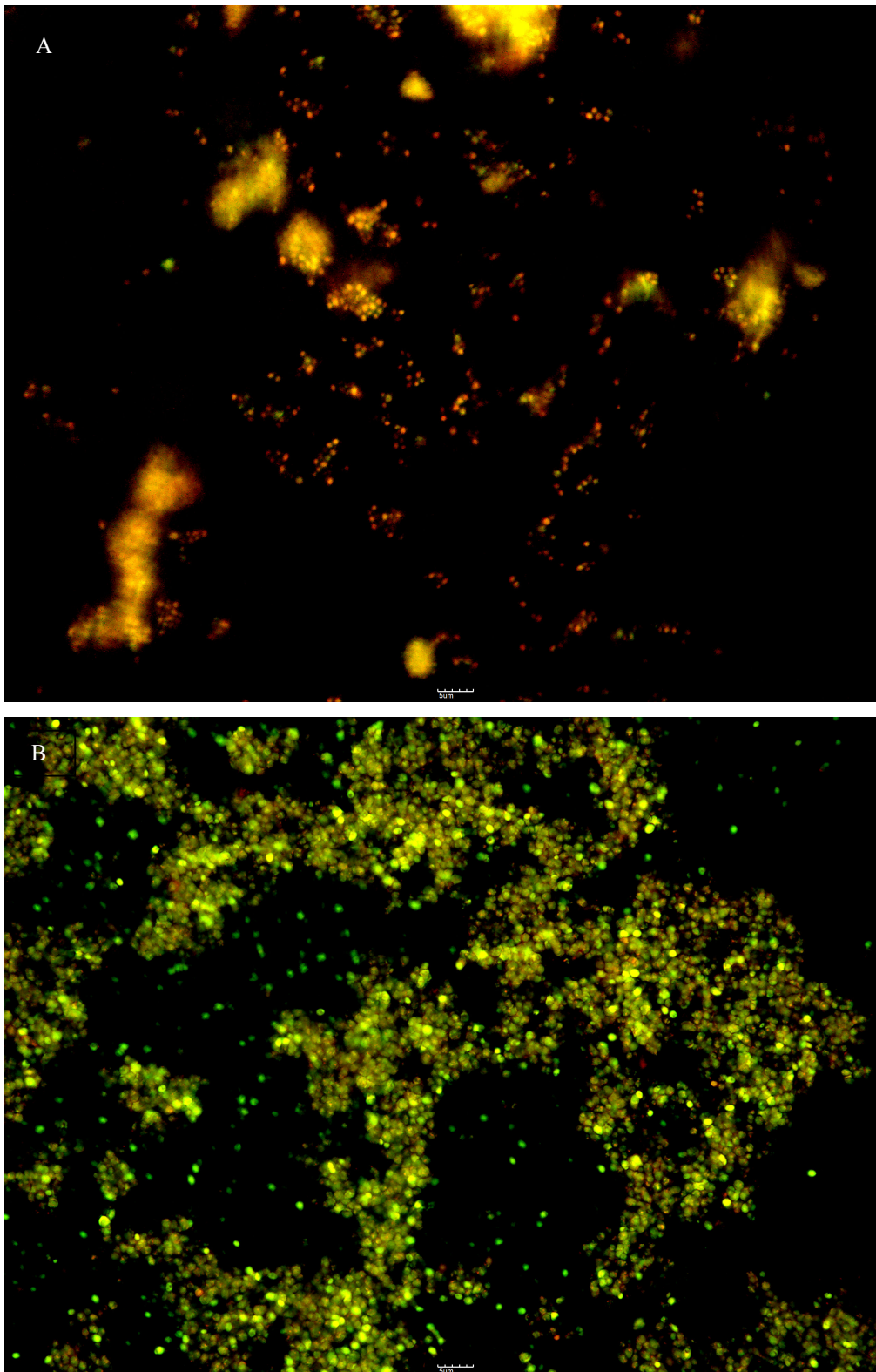


Figura 6. Atividade Antifúngica do extrato precipitado sobre biofilme de *C. glabrata* por microscopia de fluorescência. A. Biofilme tratado com 7,6 µg mL⁻¹ de extrato proteico (24h). B. Controle positivo sem tratamento com o extrato proteico.

Tabela 1. Titulação do ensaio de hemólise

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sobrenadante RV ₇ S ₃	Extrato precipitado 20%
3,04	+	+
1,52	+	+
0,76	-	-
0,38	-	-
0,19	-	-
0,095	-	-
0,0475	-	-

(+) presença de hemólise (-) ausência de hemólise