

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus*
FRENTE ÀS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii***

DANIELE SCHAAB BOFF JUNGES

**CASCAVEL
2018**

DANIELE SCHAAB BOFF JUNGES

**ATIVIDADE DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus*
FRENTE ÀS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADOR: PROF. DR. RINALDO
FERREIRA GANDRA**

**CASCADEL
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE)

J92a	<p>Junges, Daniele Schaab Boff. Atividade de micocinas produzidas por <i>Wickerhamomyces anomalus</i> frente às cepas multirresistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> / Daniele Schaab Boff Junges. --- Cascavel (PR), 2018. 57 f.: il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018. Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Inclui Bibliografia</p> <p>1. <i>Wickerhamomyces anomalus</i>. 2. <i>Acinetobacter baumannii</i>. 3. Antibiótico. 4. Sistema killer. I. Gandra, Rinaldo Ferreira. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 20.ed. 615.9523</p>
------	---

Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

Dissertação revisada conforme as normas de redação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por Iara Junges, RG 3.920.432-0, revisor habilitado, graduado em Letras pela Universidade do Oeste do Paulista.

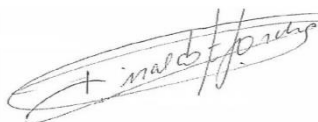
DANIELE SCHAAB BOFF JUNGES

**ATIVIDADE DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus*
FRENTE ÀS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE



Prof. Dr. Marcos Ereno Auler
Universidade Estadual do Centro-Oeste
UNICENTRO

**Cascavel
2018**

DANIELE SCHAAB BOFF JUNGES

BIOGRAFIA RESUMIDA

Daniele Schaab Boff Junges, natural de Missal, Paraná, Brasil, nascida no dia 03 de setembro de 1993, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em março de 2016. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Dr. Rinaldo Ferreira Gandra.

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração como para o Senhor, e não para os homens.”

Colossenses 3:23

A Deus,
À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que ilumina a minha vida, me dá forças para enfrentar os desafios e me faz sempre querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Liane e Adilto, que sempre me apoiaram nos estudos. Obrigada mãe, por todo o cuidado, amor e ensinamentos. Obrigada pai por me ensinar o valor do trabalho e da honestidade. Vocês são os meus exemplos de vida, e eu sou imensamente grata por tudo. Com certeza sem vocês eu não chegaria até aqui.

Ao meu esposo Eduardo, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos, compreendeu minha ausência nos dias conturbados e que sempre vibrou comigo nos dias de vitória.

À minha família, que sempre me apoiou e me deu muito amor. Agradeço de coração aos meus avós Maria, Valter e Elveda, pela preocupação e amor incondicional. Também agradeço aos meus sogros, que não medem esforços para ver a minha felicidade.

Aos meus grandes colegas de laboratório, Mateus, Lana, Bruna e Juliane que alegraram os meus dias e me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao meu orientador Rinaldo, que me auxiliou nesta caminhada. Agradeço pela oportunidade, ensinamentos e amizade.

Aos colegas de turma do mestrado, foi um prazer estudar com vocês.

Às amigas que fiz em Cascavel, guardo todas no coração.

À professora Luciana, que me incentivou a cursar o mestrado.

Aos professores do curso de Farmácia e do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, obrigada pelo conhecimento cedido.

A todos, muito obrigada!

ATIVIDADE DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* FRENTE ÀS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*

RESUMO

O sistema *killer* consiste na produção de substâncias por leveduras *killer* capazes de inibir outros microrganismos. Isso ocorre no habitat natural como uma forma de competição entre as espécies pela garantia de nutrientes. *Wickerhamomyces anomalus* é uma levedura produtora de micocinas amplamente distribuída no ambiente e resistente a condições extremas de pH, temperatura e osmolaridade. Devido a essas características, esta levedura vem sendo utilizada em vários processos industriais, principalmente na indústria alimentícia como controle de microrganismos contaminantes. Sua ação é considerada minimamente tóxica às células humanas e de baixo potencial à indução de resistência aos microrganismos, características que tornam as micocinas de *W. anomalus* interessantes candidatas à aplicação médica. *Acinetobacter baumannii* é uma preocupação mundial devido à sua multirresistência, tendo por isso alta taxa de mortalidade e morbidade, principalmente em ambientes hospitalares. Este trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana de micocinas produzidas por *W. anomalus* frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii* e avaliar a toxicidade destes compostos. Os sobrenadantes de WA40, WA45 e WA92 foram testados sobre *A. baumannii* utilizando os métodos de microdiluição em caldo, testes em meio sólido e viabilidade de *A. baumannii*. Para avaliar a toxicidade, fez-se os testes de hemólise e de toxicidade em *Artemia salina* Leach. Resultados evidenciaram a atividade antimicrobiana de micocinas de *W. anomalus*, uma vez que, mesmo altamente diluídas, elas foram capazes de inibir *A. baumannii*. Em meio sólido, foi possível observar a formação de zona de inibição ao testar micocinas de WA40, WA45 e WA92 sobre *A. baumannii*. E por fim, o teste de viabilidade mostrou que em apenas 3 h as micocinas de WA45 foram capazes de inibir 100% das células multirresistentes de *A. baumannii*, seguido de 4 h para WA40 e 6 h para WA92. Os três sobrenadantes não foram citotóxicos quando testados sobre hemácias e *Artemia salina*. Sendo assim, as micocinas de *W. anomalus* mostraram-se efetivas neste estudo e podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas.

Palavras chaves

Wickerhamomyces anomalus; micocinas; sistema *killer*; *Acinetobacter baumannii*; antibiótico.

MYCOCIN ACTIVITY PRODUCED BY *Wickerhamomyces anomalus* AGAINST MULTIDRUG-RESISTANCE STRAINS OF *Acinetobacter baumannii*

ABSTRACT

The killer system is the production of substances by yeast killer able to inhibit other microorganisms, this occurs in the natural environment as a way of competition between species by ensuring nutrients. *Wickerhamomyces anomalus* is a producer of yeast mycocin widely distributed in the environment and resistant to extremes of pH, temperature and osmolarity. Due to these characteristics, this yeast has been used in various industrial processes, especially in the food industry to control contaminants microorganisms. Its action is considered to be minimally toxic to human cells and low potential to induce microorganisms resistance, characteristics that makes the mycocins of *W. anomalus* an interesting candidate for medical application. *Acinetobacter baumannii* is a worldwide concern due to its multiresistance, having a high mortality rate and morbidity, especially in hospital environments. This study had as objective to determine the antimicrobial action of mycocins produced by *W. anomalus* against multiresistant strains of *A. baumannii* and to evaluate the toxicity of these compounds. The supernatants of WA40, WA45 and WA92 were tested on *A. baumannii* using the methods of broth microdilution, solid medium test and viability of *A. baumannii*. To evaluate the toxicity, was made the test of hemolysis and brine shrimp toxicity test. Results evidenced the antimicrobial activity of mycocins of *W. anomalus*, since even at high dilutions they were able to inhibit *A. baumannii*. In solid medium, it was possible to observe the formation of zone of inhibition when testing WA40, WA45 and WA92 on *A. baumannii*, and finally, the viability test showed that in only 3 hours the mycocins of WA45 were able inhibit 100% of the multidrug-resistant cells of *A. baumannii* followed by 4 h for WA40 and 6 h for WA92. The three supernatants were not cytotoxic when tested on human erythrocytes and *Artemia salina*. Thus, the micocins of *W. anomalus* were effective in this study and can be used in the development of new antimicrobial substances.

Key words

Wickerhamomyces anomalus; mycocins; *Acinetobacter baumannii*; antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de ação <i>killer</i> de micocinas do tipo glucanases	4
--	---

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
Objetivo geral	2
Objetivos específicos	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Sistema <i>killer</i>	3
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4
Aplicabilidade de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	5
<i>Acinetobacter baumannii</i> e a problemática mundial da multirresistência aos antibióticos	8
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1	16
Atividade antibiótica de micocinas de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente	17
Revista: Journal of Applied Microbiology: Qualis/Capes em Farmácia: B1	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes têm altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo. Dentre as bactérias multirresistentes, destaca-se *Acinetobacter baumannii*, que é responsável por causar pneumonia, septicemia, infecções urinárias e meningite, principalmente em pacientes imunocomprometidos. É uma bactéria versátil, que se adapta facilmente aos mais diversos ambientes, podendo se manter viável por muito tempo em superfície de equipamentos hospitalares, bancadas e leitos. Além destes locais, as mãos dos profissionais da saúde são fontes muito comuns de disseminação de infecção hospitalar.

Este cenário é preocupante, uma vez que, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções bacterianas está cada vez mais limitado. Nos últimos anos, poucos medicamentos com ação antibiótica vêm sendo lançados no mercado, fazendo-se necessário o estudo e desenvolvimento de novos antibióticos.

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura amplamente distribuída no ambiente, encontrada principalmente em frutas, plantas, insetos, solo e água. Esta já vem sendo aplicada em vários processos biotecnológicos, com destaque no controle de microrganismos contaminantes de alimentos. Algumas cepas de *W. anomalus* são produtoras de micocinas (também conhecidas como toxinas *killer*), as quais são glicoproteínas de baixo peso molecular com amplo espectro de ação inibitória sobre bactérias, leveduras, fungos filamentosos e parasitas. Essas substâncias são secretadas no ambiente como uma estratégia de competição entre espécies por espaço e nutrientes, favorecendo assim, a levedura produtora de micocinas.

Tendo em vista a necessidade de pesquisar novas substâncias antibióticas que combatam *A. baumannii* multirresistente e o potencial promissor de micocinas, este estudo teve como objetivo conhecer a suscetibilidade desta bactéria para micocinas de *W. anomalus*. Este é o primeiro trabalho envolvendo micocinas de *W. anomalus* sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade de cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, frente às micocinas presentes no sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus*.

Objetivos específicos

- Obter o sobrenadante de cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA40, WA45 e WA92) contendo micocinas;
- Testar as cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes frente aos sobrenadantes contendo as micocinas de WA40, WA45 e WA92 pelo método de microdiluição em meio líquido;
- Verificar a inibição de *Acinetobacter baumannii* em meio sólido contendo as micocinas de WA40, WA45 e WA92;
- Avaliar a viabilidade de *Acinetobacter baumannii* após tratamento com sobrenadante de WA40, WA45 e WA92;
- Conhecer o perfil de toxicidade de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA40, WA45 e WA92), utilizando o teste de hemólise e *Artemia salina* Leach.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sistema *killer*

Estudos feitos por Bevan e Makower (1963) definiram leveduras *killer* (K) como sendo capazes de promover atividade letal sobre leveduras sensíveis. Este fenômeno ocorre devido à secreção de compostos antimicrobianos denominados de micocinas, ou toxinas *killer*, sendo que a levedura que os secretou é imune à sua própria atividade, mas pode ser sensível (S) à ação *killer* de outras leveduras. No habitat natural, os fungos utilizam estes compostos letais como estratégia para eliminar concorrentes na competição por nutrientes (ROBLEDO-LEAL; VILLARREAL-TREVINO; GONZALEZ, 2012). Por fim, existem as leveduras neutras (N), as quais são resistentes às micocinas e incapazes de produzi-las.

Micocinas são metabólitos secundários, em sua maioria glicoproteínas, que provocam a perturbação da membrana celular de microrganismos sensíveis, causando morte celular (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012). O potencial antimicrobiano de leveduras foi descoberto por Hayduck (1909), enquanto que a das micocinas ocorreu em 1963, por Bevan e Makover. Após a descoberta das micocinas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae*, outras leveduras passaram a ser estudadas e identificadas com o mesmo potencial, é o exemplo dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Wickerhamomyces*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (SCHMITT; BREINIG, 2002; TAY; LIM; TAN, 2014).

Alguns mecanismos são propostos para justificar a ação das micocinas sobre outros microrganismos, sendo eles: inibição da replicação de DNA, alteração da permeabilidade de membrana, inibição da síntese de parede por β -1,3-glucano sintetase e hidrólise β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano. Porém, muitos mecanismos permanecem desconhecidos e ainda necessitam de mais estudos (STEWART, 2017).

O glucano é um importante polímero presente em bactérias e, em maior abundância, em células fúngicas. As micocinas do tipo glucanases (as mais estudadas pela literatura) atuam na hidrólise de β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano, (Figura 1), cujo fenômeno provoca a perda dos componentes citoplasmáticos e, conseqüentemente, a morte celular. Como as células de mamíferos não possuem este constituinte na membrana, o mecanismo *killer* torna-se seletivo para

microrganismos. Deste modo, considera-se que este tipo de micocinas são mínimamente tóxicas e de baixa probabilidade de indução a resistência (POLONELLI *et al.*, 1983; MIURA *et al.*, 2003; IZGU; ALTINBAY; TURELI, 2007b; IZGU; KEPEKCI; IZGU, 2011; MUCCILLI *et al.*, 2013).

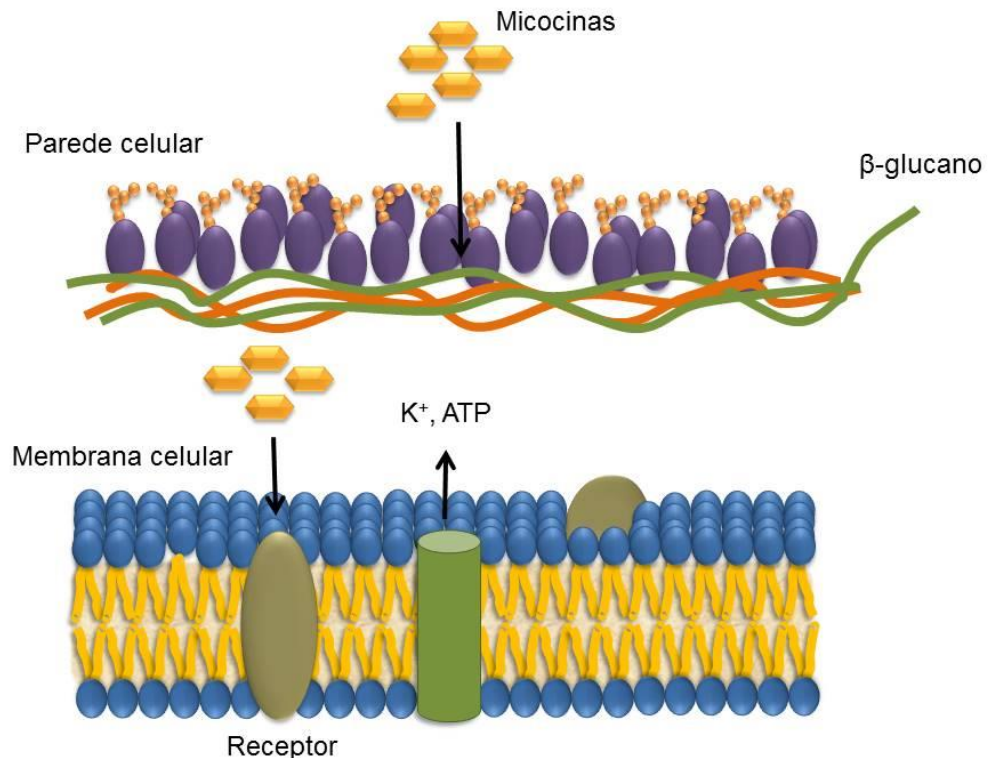


Figura 1 Mecanismo de ação *killer* de micocinas do tipo glucanases. Micocinas ligam-se ao glucano presente na parede da célula do microrganismo sensível e atinge a membrana plasmática, aumentando a permeabilidade da célula e a liberação de íons, levando a morte da célula (Adaptado de Marquina; Santos; Peinado, 2002).

Wickerhamomyces anomalus

Antigamente a identificação de espécie e a classificação do gênero de microrganismos eram realizadas de acordo com o fenótipo, ou seja, com as características morfológicas, assimilação de açúcares e capacidade de crescimento em determinados meios. Isso gerava uma série de incertezas e erros na classificação dos microrganismos. Assim, com o surgimento do sequenciamento do DNA, a determinação taxonômica passou a ser feita por comparação genética e, deste então, vários microrganismos vêm sendo reclassificados. É o exemplo de *Wickerhamomyces anomalus*, antigamente conhecida como *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*, que posteriormente foram inseridos no gênero

Wickerhamomyces (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008; KURTZMAN, 2011; RUYTERS *et al.*, 2015).

W. anomalus foi a primeira produtora de micocinas (também denominada de levedura *killer*) descoberta a ser capaz de inibir o crescimento, tanto de organismos eucariotos, quanto de procariotos patogênicos (POLONELLI *et al.*, 1986; POLONELLI *et al.*, 2011). Pesquisas comprovam que algumas cepas de *Wickerhamomyces anomalus* são capazes de produzir altos níveis de micocinas (CRAY *et al.*, 2013). Trata-se de uma levedura heterotática, que pode reproduzir-se das duas formas: assexuada (por brotamento) e sexuada (formando ascósporos em forma de chapéu). Está amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em frutas, plantas, cereais, vegetais, produtos ricos em açúcar, solo, intestino de insetos, água e no meio marinho (WALKER, 2011; SATORA *et al.*, 2014).

Embora *W. anomalus* já tenha sido relatada como causadora de infecções nosocomiais, ela acomete principalmente imunossuprimidos e é considerada uma levedura de baixa virulência, uma vez que raros casos foram notificados no mundo (DANIEL *et al.*, 2011). *W. anomalus* é definido como um microrganismo seguro para indivíduos saudáveis, segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA) (2007), recebendo o status de *Qualified Presumption of Safety* (QPS) e classificado em nível 1 em biossegurança (SUNDH; MELIN, 2010).

Esta levedura é capaz de sobreviver em uma ampla faixa de pH (entre 2 e 12), temperatura (pode variar de 3 a 37°C), baixa concentração de oxigênio (porém não em meio anaeróbico, pois o oxigênio é necessário para a síntese de ergosterol da membrana fúngica) e baixa atividade de água. Além disso, pode secretar as enzimas: invertase, peptidase, amilase, lipase e fitase. Devido à sua versatilidade fisiológica, este microrganismo pode ser aplicado em vários processos industriais (WALKER, 2011).

Aplicabilidade de *Wickerhamomyces anomalus*

Há muitos anos as leveduras desempenham um papel chave em processos industriais, como por exemplo, na otimização da fermentação de massas e inibição de fungos contaminantes de frutas e grãos de cereais como *Aspergillus flavus* (produtor de aflotoxina) (GORETTI *et al.*, 2009; CODA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; HUA *et al.*, 2015). A maioria das leveduras não são patogênicas e não produzem

micotoxinas e/ou esporos alergênicos, além de se adaptarem facilmente às diversas condições ambientais. Diante dessas vantagens, as leveduras com potencial *killer* vêm sendo utilizadas para o controle biológico de alimentos, como alternativa aos fungicidas químicos para fungos contaminantes pós-colheita (FREDLUND *et al.*, 2002; OLSTORPE; PASSOTH, 2011).

Também podem ser aplicadas nos mais diversos processos biotecnológicos como: rações, fermentação de produtos lácteos e na otimização da produção de bebidas (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Na produção de cervejas e vinhos, as condições de produção são favoráveis à contaminação microbiana (rico em nutrientes, temperatura e umidade adequada). Deste modo, o uso de micocinas auxilia no combate a microrganismos contaminantes e também contribui na qualidade sensorial do produto, conferindo melhor cor, sabor e aroma à bebida (LAITILA *et al.*, 2011; SWANGKEAW *et al.*, 2011; SATORA *et al.*, 2014; SCHWENTKE *et al.*, 2014).

Kagiyama *et al.*, (1988) isolaram *W. anomalus* de shoyu, importante ingrediente na culinária oriental, o qual revelou ser capaz de produzir micocinas na presença de proteases e alta concentração de cloreto de sódio, características deste produto. Este resultado mostra que micocinas de *W. anomalus* podem auxiliar no controle de microrganismos contaminantes do shoyu, os quais degradam o produto, como bactérias produtoras de ácido lático e fermentadoras alcólicas.

W. anomalus também está presente na investigação epidemiológica de infecções nosocomiais, pela biotipagem de microrganismos patogênicos, através da sensibilidade às leveduras *killer*. Essa ferramenta epidemiológica foi padronizada por Polonelli *et al.*, (1983) ao testar a sensibilidade de microrganismos para nove cepas *killer* do gênero *Pichia* e *Hansenula*, onde, um código de três dígitos é gerado como resultado. Dessa forma, Polonelli possibilitou investigar a origem do microrganismo, em um surto hospitalar, por exemplo, ou caracterizá-lo de acordo com o fenótipo *killer*.

Estudos mostraram a atividade inibitória de *W. anomalus* sobre as espécies de leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, as quais possuem importância clínica devido à sua capacidade de provocar infecções. Desta forma, foi evidenciado o potencial de *W. anomalus* para aplicação na medicina através do desenvolvimento de produtos antibióticos a base de micocinas (GUO *et al.*, 2013; TAY; LIM; TAN, 2014).

Micocina semi-purificada de *W. anomalus* mostrou atividade inibitória quando testada via tópica sobre lesões em animais, provocadas por *Malassezia furfur* e

Malassezia pachydermatis. Este estudo *in vivo* fundamenta o potencial inibitório de micocinas, via tópica, no tratamento de microrganismos sensíveis (POLONELLI *et al.*, 1986). Para o tratamento de micoses por via sistêmica, é necessário um longo tratamento com antifúngicos, os quais causam efeitos colaterais como problemas gastrointestinais e hepatotoxicidade, além de serem passíveis de interagirem com outros medicamentos. Portanto, o uso de micocinas no tratamento tópico dessas infecções poderia otimizar o tratamento destes pacientes, reduzindo a dose do tratamento via oral (IZGU; ALTINBAY; TURELI, 2007a).

W. anomalus está naturalmente presente na microbiota intestinal e nas gônadas de mosquitos *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, tendo uma relação simbiótica com os insetos, ou seja, o inseto proporciona à levedura um local para a sobrevivência, enquanto ela o oferece nutrientes e proteção contra microrganismos patogênicos. Como já é conhecido, estes insetos são os vetores de várias doenças como dengue, febre amarela e malária. Estudos feitos por Ricci *et al.*, (2011) abordam o interesse sobre *W. anomalus* no biocontrole de doenças transmitidas pelos mosquitos citados acima.

Outra possível aplicação de *W. anomalus* é na biorremediação, visando o tratamento de contaminantes provenientes de resíduos industriais. Fernandez *et al.*, (2012) estudou o uso de *W. anomalus* no tratamento de águas residuais contendo cromo, um metal pesado, oriundo da produção de aço, conservação da madeira, pigmentos e curtumes. Esta levedura é capaz de adaptar-se ao meio altamente poluído e metabolizar os compostos tóxicos com baixo custo, de modo atóxico e inovador, comparado aos métodos habituais.

A cepa *W. anomalus* YF07b isolada do ambiente marinho, produziu micocina com efeito inibitório sobre *Metschnikowia bicuspidate*, uma levedura patogênica para invertebrados aquáticos, que gera grande perda econômica na aquicultura. Esta micocina tem pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 40°C, possui peso molecular de 47,0 kDa e quanto ao seu mecanismo de ação, é classificada como β -1,3-D-glucanase (WANG, *et al.*, 2007).

Micocina de *W. anomalus* DBVPG 3003 (Pikt) foi capaz de inibir as cepas de *Dekkera brettanomyces*, as quais são leveduras comumente envolvidas na deterioração do vinho. Esta micocina tem pH ótimo de 4,4, peso molecular de 3-10 kDa e sofre inativação acima de 40°C (COMITINI *et al.*, 2004). Outras aplicações incluem: produção de biofármacos, biocombustíveis com aumento do rendimento na produção de bioetanol (TAO; GAO; LIU, 2011; WALKER, 2011).

Apesar das micocinas possuírem um alto poder antibiótico, sabe-se que elas possuem limitações para o desenvolvimento de medicamentos sistêmicos. Isso ocorre devido a antigenicidade das moléculas, a necessidade de um pH ácido para a sua ação e também são inativadas acima de 37°C. Sendo assim, as micocinas são atraentes candidatas ao desenvolvimento de soluções tópicas (MAGLIANI *et al.*, 2004).

***Acinetobacter baumannii* e a problemática mundial da multirresistência aos antibióticos**

O aumento da resistência de microrganismos aos antimicrobianos ocorre principalmente devido à aquisição de genes, os quais podem ser adquiridos via plasmídeo, transposons e/ou integrons. A resistência microbiana provoca uma série de infecções difíceis de tratar, causando aumento de morbidade e mortalidade e consequentemente, elevando os custos relacionados à saúde (MAGLIANI *et al.*, 2004). O aumento da resistência de bactérias Gram-negativas constitui uma ameaça mundial à saúde pública, uma vez que cada vez mais antibióticos estão tornando-se ineficazes a esses patógenos (CHEAH *et al.*, 2016).

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, encapsulado, não fermentador, aeróbico e ubíquo (LAZUREANU *et al.*, 2016). É normalmente encontrado em solo, água, pele e mucosas de humanos e animais, sendo capaz de crescer em ampla faixa de pH e temperatura e assimila grande variedade de substratos (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010)

Atualmente é considerado um preocupante patógeno oportunista em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Na comunidade, é capaz de causar principalmente pneumonia e no ambiente hospitalar, pode causar pneumonia associada principalmente à ventilação mecânica, septicemia, infecções de pele, endocardite, infecção urinária e meningite. *A. baumannii* possui desenvolvida resistência aos antibióticos, característica que vem aumentando nas últimas décadas, sugerido como consequência do uso irracional de antibióticos. Algumas cepas já vêm sendo reportadas como resistentes a colistina e tigeciclina, considerados os últimos antibióticos de escolha (KEMPF; ROLAIN, 2012; WARNER *et al.*, 2016).

Dois principais fatores contribuem para a alta disseminação de *A. baumannii*: desenvolvida resistência aos antibióticos e alta resiliência ambiental (LIN; LAN, 2014). A capacidade de manter-se viável sobre superfícies por longo tempo e sobre

diversas condições ambientais faz com que esse microrganismo esteja rotineiramente envolvido em surtos nosocomiais. Os fatores de risco aos pacientes para a infecção por *A. baumannii* são: prematuridade de recém-nascidos, longo período de internamento, estadia em UTI, exposição a materiais invasivos e a equipamentos médicos (ventilação mecânica principalmente), gravidade da doença base e uso de antimicrobianos induzindo a resistência. A transmissão ocorre geralmente por gotículas de água, pele de pacientes colonizados ou infectados e principalmente, pelas mãos dos profissionais de saúde (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; MARAGAKIS; PERL, 2008).

Este microrganismo é capaz de formar biofilme sobre materiais médicos e superfícies biológicas. A formação dessa estrutura é um mecanismo de resistência a diversos ataques, como aos antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (RICHMOND *et al.*, 2016).

Os mecanismos de resistência de *A. baumannii* aos antibióticos podem ser de vários tipos, incluindo: enzimas que inativam os antimicrobianos, difícil acesso ao alvo bacteriano e mutações que provocam mudança de alvo ou função celular. O tratamento de *A. baumannii* consiste principalmente dos seguintes antibióticos: carbapenêmicos (meropenem, imipinem), inibidores da β -lactamase (sulbactam), tigeciclina, aminoglicosídeos (amicacina, tobramicina) (MARAGAKIS; PERL, 2008). Porém, muitos focos de resistência a esses antibióticos já foram relatados, por isso, tem-se utilizado novamente a polimixina em casos especiais de completa resistência aos antibióticos atuais. Diante da realidade, cada vez mais tem-se preocupado com infecções por *A. baumannii* devido à facilidade desta bactéria adquirir genes que lhe conferem resistência, fazendo da situação uma ameaça à saúde mundial (KWON *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2016).

Desde os anos 1930 os antibióticos vêm sendo amplamente utilizados e milhões de vidas foram salvas. Porém, a eficácia deste recurso está comprometida. Os antibióticos forçam uma pressão seletiva sobre os microrganismos, induzindo sua adaptação para a resistência. Entretanto, a indústria farmacêutica não está suprindo este problema, ou seja, nos últimos anos poucos antibióticos têm sido lançados no mercado (HUGHES, 2011).

Finalizando, faz-se necessário o desenvolvimento de novas substâncias preventivas e terapêuticas aos microrganismos multirresistentes. Dentre as substâncias atualmente estudadas, estão as micocinas, as quais se mostram efetivas contra vários microrganismos nos mais diversos ramos, inclusive aos de

importância clínica (TAN; TAY, 2011). Deste modo, micocinas tornaram-se atraentes candidatas à aplicação médica, visando o desenvolvimento promissor de novos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceeding of the Fifth International Conference on Genetics**, The Netherlands: Pergamon Press, v. 1, p. 202-203, 1963.
- CHEAH, S. E.; LI, J.; TSUJI, B. T.; FORREST, A.; BULITTA, J. B.; NATION, R. L. Colistin and polymyxin B dosage regimens against *Acinetobacter baumannii*: Differences in activity and the emergence of resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 3921-3933, 2016.
- CODA, R.; CASSONE, A.; RIZZELLO, C. G.; NIONELLI, L.; CARDINALI, G.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3484-3492, 2011.
- COMITINI, F.; INGENIIS DE, J.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 235-240, 2004.
- CRAY, J. A.; BELL, A. N.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A. Y.; TIMSON, D. J.; HALLSWORTH, J. E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microb Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 453-492, 2013.
- DANIEL, H. M.; MOONS, M. C.; HURET, S.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 63-73, 2011.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939-951, 2007.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA—Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal* 2007;5(12):587, 16 pp. doi:10.2903/j.efsa.2007.2587
- FERNANDEZ, P. M.; MARTORELL, M. M.; FARINA, J. I.; FIGUEROA, L. I. Removal efficiency of Cr⁶⁺ by indigenous *Pichia* sp. isolated from textile factory effluent. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395-402, 2002.
- GORETTI, M.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; BRANDA, E.; CORAZZI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A.; BUZZINI, P. In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2–3, p. 178-182, 2009.

GUO, F. J.; MA, Y.; XU, H. M.; WANG, X. H.; CHI, Z. M. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 4, p. 737-746, 2013.

HATOUM, R., LABRIE, S. E FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p. 1-12, 2012.

HAYDUCK, F. Uber einen Hefengiftstoff in Hefe. **Wochenschrift für Brauerei**. v. 26, p. 677-679, 1909.

HUA, S. S.; HERNLEM, B. J.; YOKOYAMA, W.; SARREAL, S. B. Intracellular trehalose and sorbitol synergistically promoting cell viability of a biocontrol yeast, *Pichia anomala*, for aflatoxin reduction. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 729-734, 2015.

HUGHES, J. M. Preserving the lifesaving power of antimicrobial agents. **JAMA**, v. 305, n. 10, p. 1027-1028, 2011.

IZGU, D. A.; KEPEKCI, R. A.; IZGU, F. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 85-91, 2011.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; TURELI, A. E. *In vitro* activity of panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 31-34, 2007a.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; TURELI, A. E. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 9, p. 797-803, 2007b.

KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New Killer Toxins of Halophilic *Hansenula anomala*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 1988.

KEMPF, M.; ROLAIN, J. M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 2, p. 105-114, 2012.

KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 13-23, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 939-954, 2008.

KWON, S. H.; AHN, H. L.; HAN, O. Y.; LA, H. O. Efficacy and safety profile comparison of colistin and tigecycline on the extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 340-346, 2014.

LAITILA, A.; SARLIN, T.; RAULIO, M.; WILHELMSON, A.; KOTAVIITA, E.; HUTTUNEN, T.; JUVONEN, R. Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 75-84, 2011.

LAZUREANU V.; POROSNICU M.; GANDAC C.; MOISIL T.; BADITOIU L.; LAZA R.; MUSTA V.; CRISAN A.; MARINESCU A. R. Infection with *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in the Western part of Romania. **BMC Infectious Diseases** v.16, p. 23-28, 2016.

LIMA, J. R. D.; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 203-211, 2014.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014.

LIU, L.; CUI, Y.; ZHENG, B.; JIANG, S.; YU, W.; SHEN, P.; JI, J.; LI, L.; QIN, N.; XIAO, Y. Analysis of tigecycline resistance development in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates through a combined genomic and transcriptomic approach. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; SALATI, A.; VACCARI, S.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D. L.; POLONELLI, L. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2004.

MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 291, 2010.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254-1263, 2008.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, v.5, n. 2, p. 65-71, 2002.

MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; OHNO, N. Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 3, p. 173-182, 2003.

MUCCILLI, S.; WEMHOFF, S.; RESTUCCIA, C.; MEINHARDT, F. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. **Yeast**, v. 30, n. 1, p. 33-43, 2013.

OLSTORPE, M.; PASSOTH, V. *Pichia anomala* in grain biopreservation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 57-62, 2011.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer System: a Simple Method for Differentiating *Candida albicans* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; DE BERNARDIS, F.; MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. **Mycopathologia**, v. 96, n. 2, p. 103-107, 1986.

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 35-41, 2011.

QI, L.; LI, H.; ZHANG, C.; LIANG, B.; LI, J.; WANG, L.; DU, X.; LIU, X.; QIU, S.; SONG, H. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 483, 2016.

RICHMOND, G. E.; EVANS, L. P.; ANDERSON, M. J.; WAND, M. E.; BONNEY, L. C.; IVENS, A.; CHUA, K. L.; WEBBER, M. A.; SUTTON, J. M.; PETERSON, M. L.; PIDDOCK, L. J. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. **MBio**, v. 7, n. 2, 2016.

RICCI, I.; MOSCA, M.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; SCUPPA, P.; ROSSI, P.; CROTTI, E.; CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; CAPONE, A.; ESPOSITO, F.; ALMA, A.; MANDRIOLI, M.; SACCHI, L.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; FAVIA, G. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 43-50, 2011.

ROBLEDO-LEAL, E.; VILLARREAL-TREVINO, L.; GONZALEZ, G. M. Occurrence of killer yeasts in isolates of clinical origin. **Tropical biomedicine**, v. 29, n. 2, p. 297-300, 2012.

RUYTERS, S.; MUKHERJEE, V.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M.; WILLEMS, K. A.; LIEVENS, B. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 39-48, 2015.

SATORA, P.; TARKO, T.; SROKA, P.; BLASZCZYK, U. The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 5, p. 729-740, 2014.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 257-276, 2002.

SCHNEIDER, J.; RUPP, O.; TROST, E.; JAENICKE, S.; PASSOTH, V.; GOESMANN, A.; TAUCH, A.; BRINKROLF, K. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 3, p. 382-386, 2012.

SCHWENTKE, J.; SABEL, A.; PETRI, A.; KONIG, H.; CLAUS, H. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* AS1 secretes a multifunctional exo-beta-1,3-glucanase with implications for winemaking. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 349-359, 2014.

SUNDH, I.; MELIN, P. Safety and regulation of yeasts intentionally added to the food or feed chains. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 99, p.113–119, 2010.

SWANGKEAW, J.; VICHITPHAN, S.; BUTZKE, C. E.; VICHITPHAN, K. Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 423-430, 2011.

STEWART, G. G. Killer (Zymocidal) Yeasts. *Brewing and Distilling Yeast*. Gewerbestrasse: Springer, p. 196, 2017.

TAN, H. W.; TAY, S. T. Anti-Candida activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 1, p. 175-180, 2011.

TAO, N.; GAO, Y.; LIU, Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 668-675, 2011.

TAY, S. T.; LIM, S. L.; TAN, H. W. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 439, 2014.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25-34, 2011.

WANG, X.; CHI Z.; YUE L.; LI, J. Purification and Characterization of Killer Toxin from a Marine Yeast *Pichia anomala* YF07b Against the Pathogenic Yeast in Crab. **Current Microbiology**, v. 55, n.5, p. 396-401, 2007.

WARNER, W. A.; KUANG, S. N.; HERNANDEZ, R.; CHONG, M. C.; EWING, P. J.; FLEISCHER, J.; MENG, J.; CHU, S.; TERASHITA, D.; ENGLISH, L.; CHEN, W.; XU, H. H. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from two hospital outbreaks in Los Angeles County, California, USA. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 194, 2016.

CAPÍTULO 1

Atividade antibiótica de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente

Revista: Journal of Applied Microbiology: Qualis/Capes em Farmácia: B1

Running headline: Ação antibiótica de micocinas

Daniele S. B. Junges*, Mateus F. Delabeneta, Lana Rubia B. Rosseto, Bruna L. Nascimento, Juliane Michelin, Cristiane Persel, Eduardo A. Loth e Rinaldo F. Gandra.

Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves, 3224, Cascavel, Paraná 85806-470, Brasil

Autor correspondente*

Daniele Schaab Boff Junges, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves, 3224, Cascavel, Paraná 85806-470, Brasil
E-mail: daniele.boff@outlook.com

1 **Resumo**

2

3 **Objetivos:** Avaliar a suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* multirresistente
4 para as micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* e verificar a
5 toxicidade desses compostos. **Métodos:** Três sobrenadantes (WA40, WA45 e
6 WA92) de cultivo de *W. anomalus*, contendo micocinas, foram testados sobre *A.*
7 *baumannii* utilizando os métodos de microdiluição em caldo, testes em meio sólido,
8 viabilidade de *A. baumannii* e testes de citotoxicidade em eritrócitos humanos e em
9 *Artemia salina* Leach. **Resultados:** *W. anomalus* foi capaz de produzir micocinas de
10 elevada ação antimicrobiana, pois, mesmo em altas diluições elas inibiram *A.*
11 *baumannii*. Em meio sólido, foi possível observar a inibição de *A. baumannii*,
12 causada pela difusão de micocinas entre o ágar. O teste de viabilidade mostrou que
13 em apenas 3 h as micocinas de WA45 inviabilizaram as células multirresistentes de
14 *A. baumannii*, seguido de 4 h para WA40 e 6 h para WA92. E, por fim, os três
15 sobrenadantes não foram citotóxicos quando testados sobre eritrócitos humanos e
16 *Artemia salina*. **Conclusões:** Conforme as evidências deste trabalho, as micocinas
17 de *W. anomalus* mostraram-se efetivas e podem ser utilizadas no desenvolvimento
18 de novas substâncias antimicrobianas.

19

20 **Significado e impacto do estudo:** Este artigo apresenta o potencial de micocinas
21 de *Wickerhamomyces anomalus* em inibir cepas de *Acinetobacter baumannii*
22 multirresistente em poucas horas e de baixa citotoxicidade sobre células humanas.
23 Poucos estudos são encontrados na literatura sobre micocinas de *W. anomalus*
24 inibindo bactérias, e em nosso conhecimento, nosso estudo é o único envolvendo
25 micocinas de *W. anomalus* e *A. baumannii*.

26

27 **Palavras-chave:** micocinas, toxinas killer, leveduras killer, antibiótico,
28 *Wickerhamomyces anomalus*, *Acinetobacter baumannii*, multirresistência

29

30 **Introdução**

31

32 Há milhares de anos as leveduras desempenham um papel chave na
33 produção de alimentos como, na fabricação do pão, vinho e cerveja (Steensels *et al.*
34 2014). Estudando-as, Bevan e Makover (1963) descobriram o fenômeno killer, que
35 consiste na produção de glicoproteínas (denominadas de micocinas ou toxinas
36 killer), com ação inibitória sobre outros microrganismos. As leveduras são
37 classificadas em killer (produtoras de micocinas), sensíveis (sofrem a ação inibitória)
38 e neutras (não produzem e nem sofrem a ação killer) (Bevan e Makover, 1963).

39 *Wickerhamomyces anomalus* (antigamente conhecida como *Pichia anomala* e
40 *Hansenula anomala*) foi a primeira levedura produtora de micocinas capaz de inibir o
41 crescimento, tanto de organismos eucariotos como procariotos (Polonelli *et al.* 1986;
42 Polonelli *et al.* 2011). Trata-se de uma levedura heterotática que está amplamente
43 distribuída na natureza, podendo ser encontrada em frutas, plantas, cereais,
44 vegetais, produtos ricos em açúcar, solo, intestino de insetos, água e no meio
45 marinho (Walker, 2011; Satora *et al.* 2014).

46 Vários mecanismos são propostos para justificar a ação de micocinas sobre
47 outros microrganismos, sendo eles: inibição da replicação de DNA, alteração da
48 permeabilidade de membrana, inibição da síntese de parede por β -1,3-glucano
49 sintetase e hidrólise β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano. Porém, muitos mecanismos
50 permanecem desconhecidos e ainda necessitam de mais estudos (Stewart, 2017).

51 O glucano é um importante polímero presente em bactérias e, em mais
52 abundância, em células fúngicas. As micocinas do tipo glucanases atuam na

53 hidrólise de β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano, cujo fenômeno, provoca a perda dos
54 componentes citoplasmáticos e, conseqüentemente, a morte celular. Como as
55 células de mamíferos não possuem este constituinte na membrana, este mecanismo
56 torna-se altamente seletivo aos microrganismos. Deste modo, considera-se que as
57 micocinas são minimamente tóxicas e de baixa probabilidade de indução a
58 resistência (Polonelli *et al.* 1983; Miura *et al.* 2003; Izgu *et al.* 2007b; Izgu *et al.* 2011;
59 Muccilli *et al.* 2013).

60 *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo, encapsulado, não
61 fermentador, aeróbico, ubíquo e com alta resiliência ambiental (Lin e Lan, 2014;
62 Lazureanu *et al.* 2016). Atualmente é considerado um preocupante patógeno
63 oportunista em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), uma vez que pode causar
64 pneumonia (principalmente associada à ventilação mecânica), septicemia, infecções
65 de pele, endocardite, infecção urinária e meningite (Kempf e Rolain, 2012; Warner *et*
66 *al.*, 2016). O aumento da resistência de bactérias constitui uma ameaça mundial à
67 saúde pública, tendo em vista que cada vez mais antibióticos estão tornando-se
68 ineficazes a esses patógenos e, conseqüentemente, elevando os custos
69 relacionados à saúde (Magliani *et al.* 2004; Cheah *et al.* 2016).

70 Finalizando, faz-se necessário o desenvolvimento de novas substâncias para
71 o controle dos microrganismos multirresistentes. Dentre as substâncias atualmente
72 estudadas, estão as micocinas, as quais se mostram efetivas contra vários
73 microrganismos nos mais diversos ramos, inclusive aos de importância clínica. Deste
74 modo, micocinas tornaram-se atraentes candidatas à aplicação médica, visando o
75 desenvolvimento promissor de novos antimicrobianos (Tan e Tay, 2011).

76 O objetivo deste trabalho constituiu em avaliar a suscetibilidade de cepas de
77 *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, frente às micocinas presentes no
78 sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus*, bem como verificar a citotoxicidade

79 destes compostos.

80

81 **Material e métodos**

82

83 ***Wickerhamomyces anomalus***

84

85 Três cepas de *Wickerhamomyces anomalus*, WA40 WA45 e WA92 foram
86 isoladas do solo e classificadas como leveduras produtoras de micocinas. O número
87 de acesso para as sequências de nucleotídeos no GenBank de *W. anomalus* WA40,
88 WA45 e WA92 são KT580792, KT580794 e KT580796 respectivamente, e estão
89 disponíveis no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

90

91 **Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus***

92

93 Foram inoculadas as três leveduras produtoras de micocinas em 200 mL de
94 caldo Sabouraud modificado (1% de peptona, 2% de glicose, 1.92% de ácido cítrico,
95 3.48% de fosfato de potássio dibásico, pH 4.7) e incubado 25 °C por 5 dias em
96 frasco inclinado a 180°. Após este período, o caldo foi centrifugado a 4500 g
97 durante 10 min, obtendo o sobrenadante esterilizado por membrana filtrante 0.22
98 µm, e armazenado a 4°C por no máximo 15 dias.

99

100 **Cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii***

101

102 Foram isoladas cepas de *Acinetobacter baumannii* (n=50) de amostras
103 biológicas humanas de dois laboratórios clínicos de Cascavel-PR. As cepas foram
104 recuperadas em Tryptic Soy Broth (TSB) e então transferidas (500 µL) para tubo de

105 eppendorf com glicerina (300 μ L) e armazenadas aproximadamente a -10°C .
106 Previamente aos testes, as cepas foram cultivadas em ágar nutriente 36°C por 24 h.
107

108 **Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição**

109

110 Para os testes de microdiluição foi utilizado o método M27-A3 - Clinical and
111 Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com algumas adaptações. Utilizaram-
112 se microplacas contendo 96 poços de fundo chato, dispostas em colunas
113 (enumeradas de 1 a 12) e linhas (com letras de A a H). Foram testadas cinquenta
114 cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes e *A. baumannii* ATCC 19606, as
115 quais foram previamente ajustadas à concentração 10^3 UFC mL^{-1} , por contagem em
116 câmara de Neubauer, homogeneizadas em 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH) e
117 distribuídas (100 μ L) nas colunas, onde cada coluna corresponde a uma cepa teste
118 de *A. baumannii* multirresistente. Os sobrenadantes foram diluídos em água
119 destilada estéril e adicionados aos poços da linha B a F (100 μ L), resultando nas
120 seguintes diluições (caldo MH + bactéria: sobrenadante) (puro, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16).
121 Nas linhas A e G, foram realizados os controles de esterilidade (contendo somente
122 caldo estéril) e de crescimento (contendo caldo MH e *A. baumannii*),
123 respectivamente. Após o término do procedimento, a placa foi lacrada e incubada a
124 36°C por 48 h. A última diluição onde não houve turvação foi agitada manualmente
125 e aliquotada a 10 μ L com alça calibrada e semeada em ágar nutriente. A ausência
126 de turvação no poço e ausência de crescimento em placa foi interpretado como
127 inibição da cepa testada. O teste foi realizado em triplicata.

128 **Atividade antimicrobiana em meio sólido**

129

130 **Teste de inibição em superfície**

131

132 Foram preparados dois meios de ágar Mueller Hinton (MH), um controle e
133 outro teste. O controle foi constituído de ágar MH e o teste de ágar MH e
134 sobrenadante contendo micocinas de WA45, WA40 ou WA92. Ambos os meios,
135 controle e teste, foram vertidos em placas divididas de Petri. Com alça calibrada de
136 1 μ L, foi semeada a cepa 16 (Tabela 1), no controle e no teste, posteriormente
137 incubou-se a 37 °C por 24 h. O teste foi realizado em triplicata. A cepa 16 foi
138 utilizada, pois apresentou baixa sensibilidade às micocinas de *W. anomalous* WA40,
139 WA45 e WA92.

140

141 **Verificação de zona de inibição**

142

143 Em placa de Petri, fez-se pré-fორragem com ágar-ágar e após solidificar, foi
144 adicionado ágar nutriente. A cepa 16 de *A. baumannii* multirresistente foi semeada
145 em salina 0.9% com turvação compatível a escala 0.5 de Mac Farland e com o
146 auxílio de um swab, a cepa foi semeada em placa pelo método de superfície.
147 Orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram feitos sobre o ágar nutriente
148 e então adicionaram-se 15 μ L de sobrenadante. A placa foi incubada a 36°C por 48
149 h e qualquer zona clara em torno dos orifícios foi tomado como resultado positivo.

150 Teste de viabilidade

151

152 Realizou-se o teste de viabilidade da cepa clínica 16 e da ATCC 19606 de *A.*
153 *baumannii* frente às micocinas de WA40, WA45 e WA92. *A. baumannii* (10^3 UFC mL⁻¹)
154 ¹⁾ foi inoculado em 20 mL de caldo MH homogeneizado a 20 mL de sobrenadante.
155 Com o auxílio de uma alça calibrada, alíquotas de 10 μ L foram retiradas a cada 1 h,
156 durante o período de 12 h e inoculadas por estrias quantitativas e incubadas 36 °C
157 por 24 h. Utilizando a mesma metodologia, fez-se o controle de crescimento com a
158 cepa 16, porém sem a interferência de micocinas. Após este período, as unidades
159 formadoras de colônias foram multiplicadas pela diluição. O teste foi realizado em
160 triplicata.

161

162 Teste de hemólise

163

164 O teste de citotoxicidade em eritrócitos foi realizado conforme Paris *et al.*
165 (2016). Coletou-se sangue de um indivíduo saudável em tubo contendo EDTA
166 (Ethylenediamine tetraacetic acid), o qual foi centrifugado a 2000 g por 10 min, e a
167 massa celular foi lavada três vezes com PBS (*Phosphate-buffered saline*) de pH 7.4.
168 Posteriormente, fez-se uma suspensão 4% de eritrócitos em PBS, a qual foi testada
169 sob diferentes concentrações de sobrenadante de WA40, WA45 e WA92 (puro, 1:2,
170 1:4, 1:8 e 1:16) e incubado a 37 °C por 1 h. Após esse período, os tubos foram
171 centrifugados a 2000 g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para determinar a
172 absorção em espectrofotômetro a 450 nm de comprimento de onda.

173 O mesmo procedimento foi feito para a Polimixina B 0.16 mg mL⁻¹ (testada em
174 concentração puro, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), controle de eritrócitos íntegros (eritrócitos
175 4% e PBS) e controle de hemólise (eritrócito 4% e ácido acético 4%).

176 Para calcular a porcentagem de hemólise, utilizou-se a equação abaixo:

177

$$\% \text{ Eritrócitos íntegros} = \left(1 - \frac{A \text{ sobrenadante} - A \text{ controle de eritrócitos íntegros}}{A \text{ controle de hemólise} - A \text{ controle de eritrócitos íntegros}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ hemólise} = 100 - \% \text{ eritrócitos íntegros}$$

178 Sendo:

179 A: Absorbância

180

181 **Teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach**

182

183 *Artemia salina* Leach é um microcrustáceo marinho muito utilizado em testes
184 de toxicidade de compostos ativos de extratos de plantas (Arcanjo *et al.* 2012). Os
185 três sobrenadantes foram testados quanto à sua toxicidade, segundo a metodologia
186 descrita por Meyer *et al.* (1942), com algumas adaptações. Ovos de *Artemia salina*
187 foram incubados em água do mar estéril 28 ± 2 °C por 48 h sob contínua aeração e
188 iluminação. Após eclosão, 10 náuplios (larvas) foram transferidos para tubos
189 contendo 1000, 100 e 10 ppm de sobrenadante em quantidade suficiente para (qsp)
190 5 mL de água do mar. O controle de toxicidade máxima consistiu NaOH 1 mol L^{-1} e
191 o controle atóxico continha somente água do mar. Os tubos foram incubados a $28 \pm$
192 2 °C por 24 h e o teste foi realizado em triplicata. Posteriormente, fez-se a contagem
193 de vivos e mortos com o auxílio de microscópio óptico, sendo os organismos que
194 possuíam motilidade classificados como vivos e os imóveis e sedimentados como
195 mortos.

196 Resultados

197

198 As cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (n=50) foram isoladas
199 principalmente do trato respiratório (46%), urina e secreção purulenta (16%), sangue
200 (12%) e materiais invasivos (10%), conforme ilustrado na Figura 1.

201 As micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40, WA45 e WA92
202 apresentaram atividade inibitória sobre as cinquenta cepas de *A. baumannii*
203 multirresistentes, mesmo em concentrações diluídas. As micocinas de WA45
204 obtiveram resultados inibitórios superiores às demais, seguida de WA40 e WA92.
205 Em contato com o sobrenadante puro, 100% das cepas de *A. baumannii* (n= 50)
206 foram sensíveis às micocinas das três cepas de leveduras killer e, ao diluí-las na
207 proporção 1:2, observou-se que 98% das cepas multirresistentes foram inibidas
208 pelas micocinas de WA40 e WA45 e 90% pelas micocinas de WA92. Em diluições
209 mais altas, 1:4 e 1:8, as micocinas de WA45 continuaram a apresentar maior
210 inibição, 96% e 48%, respectivamente (Figura 2). A tabela 1 apresenta a
211 suscetibilidade de cada cepa de *A. baumannii* para os três sobrenadantes e também
212 da cepa ATCC 19606, a qual permaneceu viável até a diluição 1:2 para os
213 sobrenadantes de WA40, WA45 e WA92. O teste de microdiluição de 50 cepas
214 clínicas de *A. baumannii* possibilitou a comparação do potencial killer de três
215 sobrenadantes de leveduras da mesma espécie.

216 O teste de viabilidade celular foi realizado com o objetivo de revelar o tempo,
217 em horas, que as micocinas são capazes de inviabilizar as células bacterianas de *A.*
218 *baumannii* multirresistente. Conforme mostrado na Figura 3a-d, em apenas 3 h as
219 células bacterianas (10^3 células mL⁻¹) foram inibidas pelas micocinas de WA45,
220 seguida de 4 h por micocinas de WA40 e 6 h sobre ação de micocinas de WA92.
221 Observando o controle de crescimento, é possível verificar o elevado

222 desenvolvimento da bactéria, quando esta não é influenciada por micocinas.

223 O teste de inibição em superfície de meio sólido utilizando as três leveduras
224 produtoras de micocinas, também comprova a inibição de cepa multirresistente de *A.*
225 *baumannii* (Figura 4a-c). Outro teste realizado em meio sólido, é a verificação de
226 zona de inibição. Neste, foi possível verificar a difusão e inibição das micocinas de
227 cada sobrenadante em ágar, formando um halo em torno do orifício onde foram
228 colocadas. Na Figura 5a-c, observa-se a maior inibição de *A. baumannii*
229 multirresistente por micocinas sobre o meio de WA45, seguida de WA40 e WA92.

230 Realizou-se também o teste de hemólise, a fim de conhecer a citotoxicidade
231 dos três sobrenadantes contendo micocinas. A Figura 6 evidencia a baixa ação
232 hemolítica de micocinas. Este resultado se assemelha aos níveis de hemólise
233 causada pela polimixina B, terapia de escolha no tratamento de infecções por *A.*
234 *baumannii*. Desta forma, foi possível relacionar a hemólise de um antibiótico que já é
235 comercializado e de substâncias que ainda estão sendo estudadas.

236 E, por fim, fez-se o teste de toxicidade em *Artemia salina*. Conforme Tabela 2,
237 as micocinas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92, não são tóxicas, uma vez que,
238 não houve toxicidade nos microcrustáceos testados até a concentração 1000 ppm,
239 valores padronizados para o teste em plantas.

240

241 **Discussão**

242

243 Infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* são consideradas um
244 desafio para a medicina, uma vez que esta bactéria tem se tornado cada vez mais
245 resistente aos antimicrobianos. A carência por novos antibióticos obriga a medicina a
246 voltar ao uso de antigas drogas, por exemplo, polimixina B, utilizada em testes
247 comparativos neste trabalho (Falagas *et al.* 2015).

248 A elevada prevalência de infecções do trato respiratório causada por *A.*
249 *baumannii* é justificada pelo uso de ventilação mecânica, a qual propicia a ruptura de
250 pele e mucosa, facilitando a entrada do microrganismo (Wong *et al.* 2017). Isso
251 justifica a elevada porcentagem de amostras do trato respiratório infectadas por *A.*
252 *baumannii* no presente estudo. Dados semelhantes foram encontrados na pesquisa
253 de Vahdani *et al.* (2011), onde o trato respiratório foi o sítio predominante (39%) no
254 isolamento de *A. baumannii*, seguido de urina (22%), líquido (17.5%), ferida (9.5%),
255 sangue (5%), catéter (4.5%) e outros (2.5%).

256 Diante do aumento da resistência de microrganismos e a falta de novas
257 drogas disponíveis no mercado, as micocinas vêm ganhando destaque diante dos
258 pesquisadores devido a sua capacidade antibiótica (Muccilli e Restuccia 2015).
259 Entretanto, a presença destes compostos muitas vezes é despercebida, pois, para
260 observar a sua ação, são necessárias condições experimentais adequadas, como
261 também, a seleção de uma cepa sensível para teste (Marquina *et al.* 2002). Para a
262 produção de micocinas é necessário o controle do pH, temperatura, composição
263 química e concentração celular que variam para cada levedura killer. Com isso, a
264 produção ótima da maioria das micocinas normalmente ocorre em pH 4.5 a 25 °C
265 (Magliani *et al.* 1997).

266 Conforme resultados apresentados neste estudo, micocinas de
267 *Wickerhamomyces anomalus* possuem alto potencial killer sobre *A. baumannii*
268 multirresistente. Utilizando as mesmas cepas killer, Paris *et al.* (2016) mostrou a
269 elevada atividade antimicrobiana destas micocinas sobre cepas de *Candida albicans*
270 isoladas do sangue. Neste mesmo estudo, as micocinas obtidas da parede celular
271 de *W. anomalus* WA45 também obtiveram atividade superior às demais. Comitini *et*
272 *al.* (2004) também testou diferentes concentrações de micocina de *W. anomalus*
273 (Pikt), a qual foi capaz de inibir cepas de *Dekkera brettanomyces*, levedura

274 comumente envolvida na deterioração do vinho.

275 Hatoum *et al.* (2012) isolou *W. anomalus* LMA-827 do leite e, através do
276 método microscopia eletrônica de transmissão, observou que o sobrenadante de
277 cultura dessa levedura pôde inibir *Listeria monocytogenes* LMA-1045, bactéria
278 patogênica capaz de causar meningite em humanos.

279 Em ensaio feito com cepas de enterobactérias crescidas em grãos de trigo e
280 sobre eles, inoculado *W. anomalus*, teve-se que após 60 dias de armazenamento do
281 cereal, a levedura inibiu significativamente todas as espécies de enterobactérias
282 (Olstorpe *et al.* 2011).

283 Leveduras isoladas do mosto de uva e vinho foram testadas quanto à sua
284 suscetibilidade a leveduras killer. Leveduras killer, *W. anomalus* CBS 1982 e *W.*
285 *anomalus* NCYC 434, testadas em pH 4.5, apresentaram 54% e 80% de leveduras
286 sensíveis a elas (Yap *et al.* 2000).

287 Em nosso estudo observamos a rápida ação inibitória de micocinas de *W.*
288 *anomalus*, pois, em poucas horas foram capazes de inibir células de *A. baumannii*
289 multirresistente. Klassen e Menhardt (2005) verificaram a viabilidade de *S. cerevisiae*
290 LS20 em meio contendo micocina de *Pichia acaciae* em concentração cinco vezes
291 maior de sua concentração inibitória. Após 22 h de exposição da levedura à
292 micocina, houve inibição da viabilidade celular, tempo este bastante acima do
293 apresentado por *A. baumannii* frente às micocinas não purificadas do presente
294 estudo.

295 Outro estudo feito por Paris *et al.* (2016) utilizando o método fluorescente
296 (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio), observou a viabilidade de *Candida*
297 *albicans* (10^6 UFC mL⁻¹) frente às micocinas de *W. Anomalus* WA40, WA45 e WA92
298 ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), as quais tornaram-se inviáveis após 12 h de contato. Micocinas de

299 *Kluyveromyces lactis* (50 U mL⁻¹) foram capazes de inibir *Saccharomyces cerevisiae*
300 (1 x 10⁶ UFC mL⁻¹) em apenas 4 h (Takita e Castilho-Valavicius 1993).

301 Além da inibição de bactéria, já é sabido que micocinas produzidas por *W.*
302 *anomalus* possuem atividade killer sobre outros tipos de organismos, como fungos
303 dermatófitos, leveduras, parasitas e vírus (Izgu *et al.* 2007a; Conti *et al.* 2008; Paris
304 *et al.* 2016; Valzano *et al.* 2016).

305 O teste de difusão de micocinas em ágar realizado neste trabalho, também é
306 utilizado por vários outros autores na literatura (Wang *et al.* 2012). Em metodologia
307 semelhante, Wang *et al.* (2012) observaram zonas de inibição ao testar *Williopsis*
308 *saturnus* WC91-2 sobre *Metschnikowia bicuspidate*, *Sacharomyces* sp., *Candida*
309 *albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus aureus*, *Yarrowia lipolytica* e
310 *Lodderomyces elongisporus*. Resultado compatível foi encontrado por Guo *et al.*
311 (2013), ao colocar micocina de *W. anomalus* YF07b em orifício feito em meio sólido
312 onde, por método de superfície, foi inoculado *M. bicuspidate*, uma levedura
313 patogênica para invertebrados aquáticos, responsável por gerar perda econômica na
314 aquicultura.

315 Estudo de Ahmed Sheikh (2010) obteve resultados atrativos ao testar culturas
316 de fungos isolados de solo que misturadas com saliva humana, agiram sobre
317 *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, também através do método de zona
318 de inibição.

319 Estudo feito por Comitini e Ciani (2011) comparou o tamanho do halo formado
320 por micocina de *Kluyveromyces wickerhamii* DBVPG 6077 (Kwkt) sobre
321 *Brettanomyces bruxellensis* DBVPG 6706 antes e após purificação, obtendo um
322 aumento de 50% pós-purificação.

323 Os resultados desse trabalho evidenciaram a baixa toxicidade de micocinas
324 mostradas pelos testes de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e teste de hemólise

325 em eritrócitos humanos. Seddik *et al.* (2016), mostrou atividade inibitória de *Candida*
326 *albicans* P51L1 isolada de fezes de crianças sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC
327 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. E como teste de toxicidade, verificou-
328 se que as cepas não eram hemolíticas.

329 Ceugniez *et al.* (2015) ao estudar leveduras isoladas de queijo, relatou que
330 *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* foram capazes de inibir o
331 crescimento de microrganismos patogênicos, por exemplo, *Candida albicans* e
332 *Listeria monocytogenes*. E, no mesmo estudo, em teste de hemólise em meio sólido
333 suplementado com sangue de cavalo, constatou-se que as mesmas não foram
334 hemolíticas. Paris *et al.* (2016) testou as micocinas extraídas da parede de *W.*
335 *anomalus* sobre eritrócitos humanos e obteve resultados semelhantes ao presente
336 estudo, ou seja, baixa citotoxicidade. Também, mostrou que as micocinas eram
337 menos tóxicas quando comparadas com o antifúngico Anfotericina B.

338 Neste estudo utilizou-se o modelo de toxicidade em artemias pelas vantagens
339 que ele apresenta: facilidade de manuseio, rapidez, baixo custo e pelo potencial de
340 substituir o uso de animais em ensaios toxicológicos (Rajabi *et al.* 2015). Porém, não
341 foram encontradas outras publicações envolvendo teste de toxicidade de micocinas
342 em artemias.

343 Concluindo, *Acinetobacter baumannii* multirresistente foi sensível às
344 micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* em meio líquido e sólido. Onde, as
345 micocinas de WA45 se destacaram em relação às demais, com completa inibição
346 em apenas 3 h de contato. Também, as micocinas não foram consideradas tóxicas
347 quando comparadas com Polimixina B. Sendo assim, micocinas de *W. anomalus*
348 WA40, WA45 e WA92 são atraentes candidatas ao desenvolvimento de novos
349 antibióticos capazes de combater os microrganismos multirresistentes.

350

351 **Agradecimentos**

352 Nós gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
353 Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, ao Programa de Pós-Graduação
354 Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Unioeste (PCF-UNIOESTE) e também
355 aos laboratórios que nos cederam as cepas de *Acinetobacter baumannii*
356 multirresistentes: Biovel - Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas e Laboratório
357 Álvaro - Centro de Análises e Pesquisas Clínicas.

358

359 **Conflito de interesse**

360 Nenhum conflito de interesse declarado.

361

362 **Referências**

363

364 Ahmed Sheikh, H.M. (2010) Antimicrobial activity of certain bacteria and fungi
365 isolated from soil mixed with human saliva against pathogenic microbes causing
366 dermatological diseases. *Saudi J Biol Sci* **17**, 331–339.

367

368 Arcanjo, D.D.R., Albuquerque, A.C.M., Melo-Neto, B., Santana, L.C.L.R., Medeiros,
369 M.G.F. e Citó, A.M.G.L. (2012) Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of
370 medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.* **72**, 505-
371 509.

372

373 Bevan, E.A. e Makower, M. (1963) The physiological basis of the killer character in
374 yeast. *Xth Int. Congr. Genet.*, The Netherlands: Pergamon Press **1**, 202-203.

375

376 Ceugniz, A., Drider, D., Jacques, P. e Coucheney, F. (2015) Yeast diversity in a
377 traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species
378 with associated benefits, *Food Microbiol* **52**, 177-184.

379

380 CLSI. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of
381 Yeast, Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA:
382 *Clinical and Laboratory Institute*, **22**, 8-9.

383

384 Cheah, S.E., Li, J., Tsuji, B.T., Forrest, A., Bulitta, J.B. e Nation, R.L. (2016) Colistin
385 and polymyxin B dosage regimens against *Acinetobacter baumannii*: Differences in
386 activity and the emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 3921-
387 3933.

388

389 Comitini, F. e Ciani, M. (2011) *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification
390 and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol*
391 *Lett* **316**, 77-82.

- 392
393 Comitini, F., Ingeniis de, J., Pepe, L., Mannazzu, I. e Ciani, M. (2004) *Pichia anomala*
394 and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against
395 *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 235-240.
396
- 397 Conti, G., Magliani, W., Conti, S., Nencioni, L., Sgarbanti, R., Palamara, A.T. e
398 Polonelli, L. (2008) Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer
399 peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents*
400 *Chemother* **52**, 4331-4337.
401
- 402 Falagas, M.E., Vardakas, K.Z. e Roussos, N.S. (2015)
403 Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: A review of current
404 microbiological and clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* **46**, 231-241.
405
- 406 Guo, F.J., Ma, Y., Xu, H.M., Wang, X.H. e Chi, Z.M. (2013) A novel killer toxin
407 produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie*
408 *Van Leeuwenhoek* **103**, 737-746.
409
- 410 Hatoum, R., Labrie, S. e Fliss, I. (2012) Antimicrobial and probiotic properties of
411 yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol* **3**, 421.
412
- 413 Hatoum, R., Labrie, S. e Fliss, I. (2013) Identification and Partial Characterization of
414 Antilisterial Compounds Produced by Dairy Yeasts. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **5**, 8-
415 17.
416
- 417 Izgu, D.A., Kepekci, R.A. e Izgu, F. (2011) Inhibition of *Penicillium digitatum* and
418 *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-
419 glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**,
420 85-91.
421
- 422 Izgu, F., Altinbay, D. e Tureli, A.E. (2007a) In vitro activity of panomycocin, a novel
423 exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against
424 dermatophytes. *Mycoses* **50**, 31-34.
425
- 426 Izgu, F., Altinbay, D. e Tureli, A.E. (2007b) In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to
427 Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC
428 434. *Microbiol Immunol* **51**, 797-803.
429
- 430 Kempf, M. e Rolain, J.M. (2012) Emergence of resistance to carbapenems in
431 *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J*
432 *Antimicrob Agents* **39**, 105-114.
433
- 434 Klassen, R. e Meinhardt, F. (2005) Induction of DNA damage and apoptosis in
435 *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol* **7**, 393-401.
436
- 437 Lazureanu V., Porosnicu M., Gandac C., Moisil T., Baditoiu L., Laza R., Musta V.,
438 Crisan A. e Marinescu A.R. (2016) Infection with *Acinetobacter baumannii* in an
439 intensive care unit in the Western part of Romania. *BMC Infect Dis* **16**, 23-28.
440
- 441 Lin, M.F. e Lan, C.Y. (2014) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*:
442 From bench to bedside. *World J Clin Cases* **2**, 787-814.
443

- 444 Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. e Polonelli, L. (1997) Yeast killer
445 systems. *Clin Microbiol Rev* **10**, 369-400.
- 446
- 447 Magliani, W., Conti, S., Salati, A., Vaccari, S., Ravanetti, L., Maffei, D.L. e Polonelli,
448 L. (2004) Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes.
449 *FEMS Yeast Res* **5**, 11-18.
- 450
- 451 Marquina, D., Santos, A. e Peinado, J.M. (2002) Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*
452 **5**, 65-71.
- 453
- 454 Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. e
455 McLaughlin, J.L. (1982) Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active
456 Plant Constituents. *J Med Plant Res* **45**, 31-34.
- 457
- 458 Miura, N.N., Adachi, Y., Yadomae, T., Tamura, H., Tanaka, S. e Ohno, N. (2003)
459 Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of
460 *Candida albicans*. *Microbiol and Immunol* **47**, 173-182.
- 461
- 462 Muccilli, S. e Restuccia, C. (2015) Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms* **3**,
463 588-611.
- 464
- 465 Muccilli, S., Wemhoff, S., Restuccia, C. e Meinhardt, F. (2013) Exoglucanase-
466 encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from
467 olive brine. *Yeast* **30**, 33-43.
- 468
- 469 Olstorpe, M., Schnurer, J. e Passoth, V. (2012) Growth Inhibition of Various
470 *Enterobacteriaceae* Species by the Yeast *Hansenula anomala* during Storage of
471 Moist Cereal Grain. *Appl Environ Microbiol* **78**, 292–294.
- 472
- 473 Paris, A.P., Persel, C., Serafin, C.F., Simao, R.C.G. e Gandra, R.F. (2016)
474 Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces*
475 *anomalus* Mycocins. *Curr Microbiol* **73**, 878-884.
- 476
- 477 Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M. e Morace, G. (1983) Killer System: a
478 Simple Method for Differentiating *Candida albicans* Strains. *J. Clin. Microbiol* **17**, 774-
479 780.
- 480
- 481 Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. e Morace, G. (1986) Potential
482 therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia* **96**, 103-107.
- 483
- 484 Polonelli, L., Magliani, W., Ciociola, T., Giovati, L. e Conti, S. (2011) From *Pichia*
485 *anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive
486 anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 35-41.
- 487
- 488 Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M. e Naji, T. (2015) *Artemia salina* as a model
489 organism in toxicity assessment of nanoparticles . *DARU J. Pharm. Sci* **23**, 20-24.
- 490
- 491 Satora, P., Tarko, T., Sroka, P. e Blaszczyk, U. (2014) The influence of
492 *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical
493 composition of apple wines. *FEMS Yeast Res* **14**, 729-740.
- 494

- 495 Seddik, H.A., Ceugniz, A., Bendali, F., Cudennec, B. e Drider, D. (2016) Yeasts
496 isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species,
497 non-*albicans Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **198**,
498 71-81.
- 499
- 500 Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K. e
501 Verstrepen, K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial
502 diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 947-995.
- 503
- 504 Stewart, G.G. (2017) Killer (Zymocidal) Yeasts. *Brewing and Distilling Yeast*.
505 *Gewerbestrass*: Springer, p. 196.
- 506
- 507 Takita, M.A. e Castilho-Valavicius, B. (1993) Absence of Cell Wall Chitin in
508 *Saccharomyces cerevisiae* leads to Resistance to *Kluyveromyces lactis* Killer Toxin.
509 *Yeast* **9**, 589-598.
- 510
- 511 Tan, H.W. e Tay, S.T. (2011) Anti-*Candida* activity and biofilm inhibitory effects of
512 secreted products of tropical environmental yeasts. *Trop Biomed* **28**, 175-180.
- 513
- 514 Vahdani, P., Yaghoubi, T. e Aminzadeh, Z. (2011) Hospital acquired antibiotic-
515 resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. *Int*
516 *J Prev Med* **2**, 127-130.
- 517
- 518 Valzano, M., Cecarini, V., Cappelli, A., Capone, A., Bozic, J., Cuccioloni, M., Epis, S.,
519 Petrelli, D., Angeletti, M., Eleuteri, A.M., Favia, G. e Ricci, I. (2016) A yeast strain
520 associated to Anopheles mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites.
521 *Malar J* **15**, 21.
- 522
- 523 Walker, G.M. (2011) *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to
524 other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 25-34.
- 525
- 526 Wang, X.X., Chi, Z., Peng, Y., Wang, X.H., Ru, S.G. e Chi, Z.M. (2012) Purification,
527 characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived
528 yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol Res* **167**, 558-563.
- 529
- 530 Warner, W.A., Kuang, S.N., Hernandez, R., Chong, M.C., Ewing, P.J., Fleischer, J.,
531 Meng, J., Chu, S., Terashita, D., English, L., Chen, W. e Xu, H.H. (2016) Molecular
532 characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates
533 obtained from two hospital outbreaks in Los Angeles County, California, USA. *BMC*
534 *Infect Dis* **16**, 194.
- 535
- 536 Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B. e Spellberg,
537 B. (2017) Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a
538 Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev* **30**, 409-447.
- 539
- 540 Yap, N.A., Lopes, M.B., Langridge, P. e Henschke, P.A. (2000) The incidence of
541 killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts to wards indigenous yeast species of
542 grape must: potential application in wine fermentation. *J. Appl. Microbiol* **89**, 331-389.

543 **Tabela 1** Suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* multirresistente às cepas killer
 544 de *Wickerhamomyces anomalus* WA40, WA45 e WA92
 545

Cepa <i>A.baumannii</i>	Diluições dos Sobrenadantes			Cepa <i>A.baumannii</i>	Diluições dos Sobrenadantes		
	WA40	WA45	WA92		WA40	WA45	WA92
1	1:2	1:4	1:2	26	1:4	1:4	1:2
2	1:2	1:8	1:2	27	1:16	1:2	1:8
3	1:2	1:8	1:2	28	1:4	1:8	1:2
4	1:2	1:8	1:2	29	1:2	1:4	1:2
5	1:2	1:4	1:2	30	1:4	1:4	1:4
6	1:4	1:8	1:2	31	1:8	1:4	1:4
7	1:4	1:4	1:2	32	1:4	1:8	1:4
8	1:4	1:8	1:2	33	1:2	1:4	1:2
9	1:2	1:4	1:2	34	1:2	1:16	1:2
10	1:2	1:4	Puro	35	1:4	1:8	1:8
11	1:4	1:8	1:2	36	1:4	1:8	1:4
12	1:4	1:4	1:2	37	Puro	1:4	Puro
13	1:4	1:16	1:2	38	1:2	1:4	1:2
14	1:4	1:8	1:2	39	1:2	1:4	1:2
15	1:4	1:8	1:4	40	1:8	1:8	1:8
16*	1:2	1:2	1:2	41	1:2	1:8	1:2
17	1:4	1:4	1:2	42	1:2	1:4	Puro
18	1:2	1:4	1:2	43	1:8	1:4	1:8
19	1:2	1:4	1:2	44	1:4	1:4	1:2
20	1:4	1:8	1:4	45	1:4	1:8	1:2
21	1:4	1:4	1:4	46	1:4	1:8	1:2
22	1:4	1:8	1:4	47	1:4	1:8	1:2
23	1:4	1:4	1:2	48	1:4	1:8	Puro
24	1:2	1:8	1:2	49	1:8	1:4	1:2
25	1:2	1:8	Puro	50	1:4	1:4	1:4

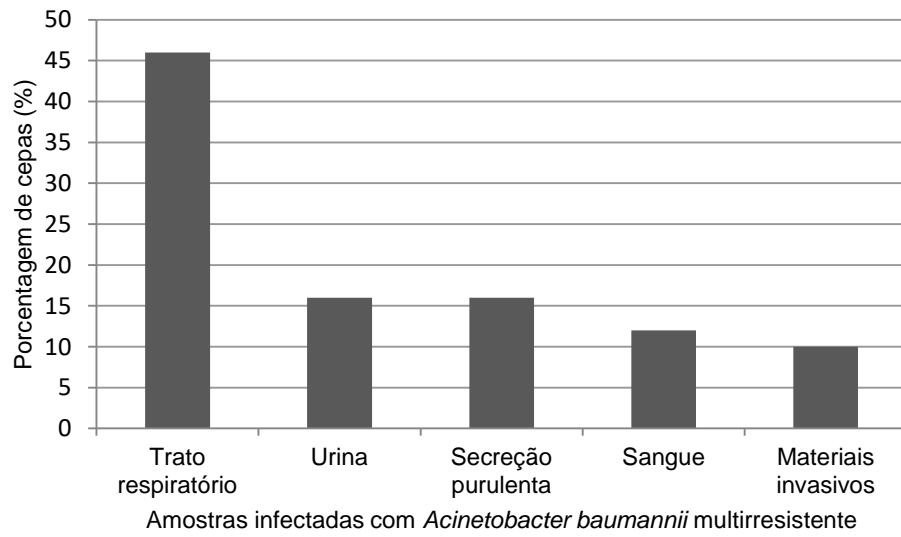
546 * Cepa número 16: utilizada em testes em meio sólido e em teste de viabilidade.
 547 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 apresentou o seguinte perfil: WA40 (1:2),
 548 WA45 (1:2) e WA92 (1:2).
 549

550 **Tabela 2** Teste de toxicidade dos sobrenadantes de WA40, WA45 e WA92 em
551 *Artemia salina* Leach

552

Concentração de sobrenadante	Náuplios vivos			Náuplios mortos		
	WA40	WA45	WA92	WA40	WA45	WA92
10 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
10 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
10 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
100 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
100 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
100 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
1000 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
1000 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0
1000 mL L ⁻¹	10	10	10	0	0	0

- 553 **Figura 1** Distribuição das cepas (n=50) de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes
554 conforme os materiais onde foram isoladas.
555
- 556 **Figura 2** Suscetibilidade de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*
557 (n=50) às micocinas de sobrenadante de cultura de *Wickerhamomyces anomalus*
558 WA40, WA45 e WA92.
559
- 560 **Figura 3a-d.** Teste de viabilidade de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e cepa
561 multirresistente (cepa 16) em contato com sobrenadante de WA40 (a), WA45 (b),
562 WA92 (c) e polimixina B (d) usada como controle positivo.
563
- 564 **Figura 4a-c.** Atividade antimicrobiana de sobrenadante de WA40 (a), WA45 (b) e
565 WA92 (c) sobre *Acinetobacter baumannii* em meio sólido. Controles positivos (lado
566 direito da placa), e os testes (esquerda).
567
- 568 **Figura 5a-c.** Zona de inibição: atividade killer de *Wickerhamomyces anomalus*
569 WA40 (a) WA45 (b) e WA92 (c) em meio sólido sobre cepa de *Acinetobacter*
570 *baumannii* multirresistente.
571
- 572 **Figura 6** Ação hemolítica dos sobrenadantes de WA40, WA45 e WA92 e de
573 Polimixina B sobre eritrócitos humanos.

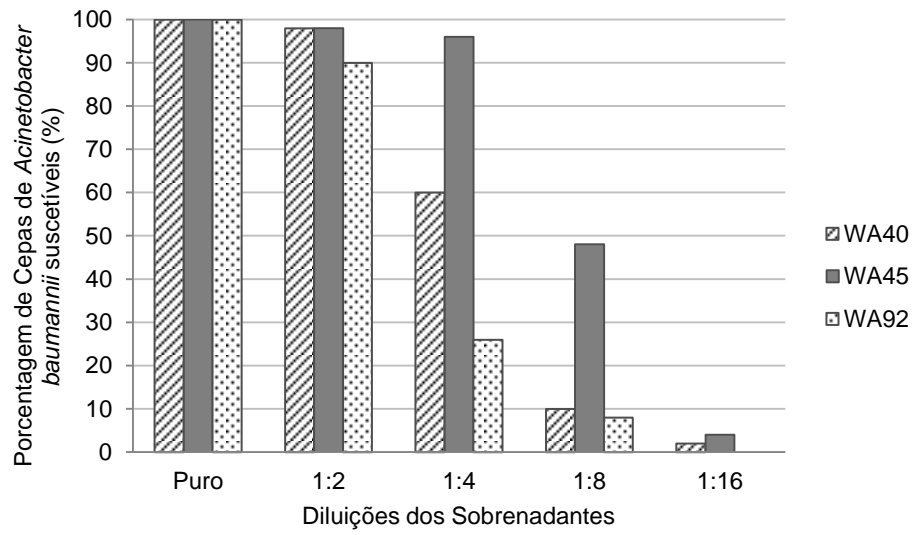


574

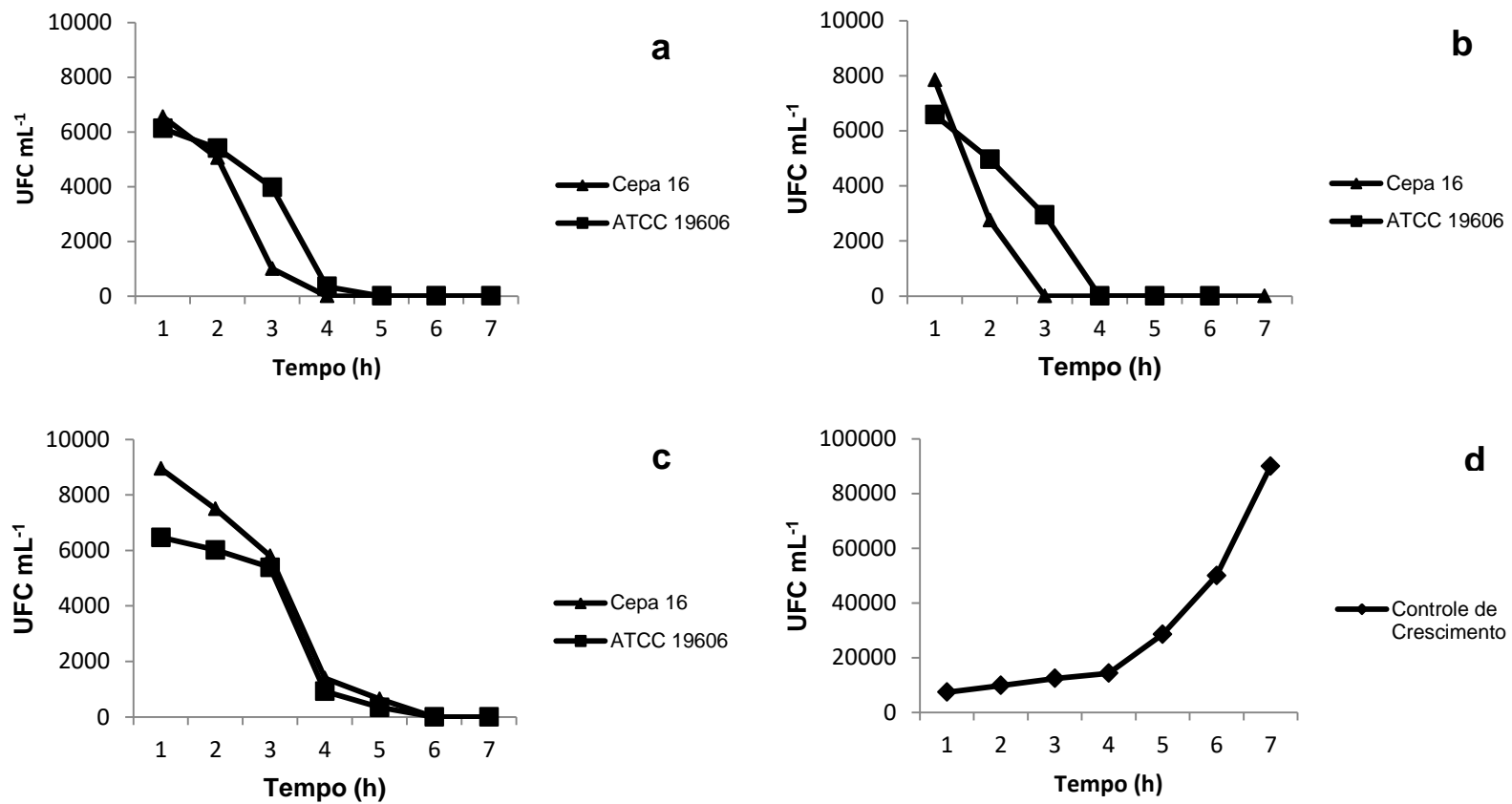
575

576

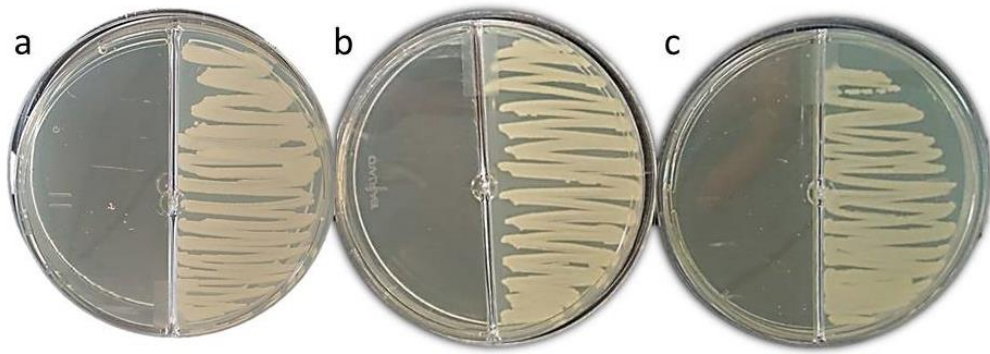
Figura 1



577
578 **Figura 2**

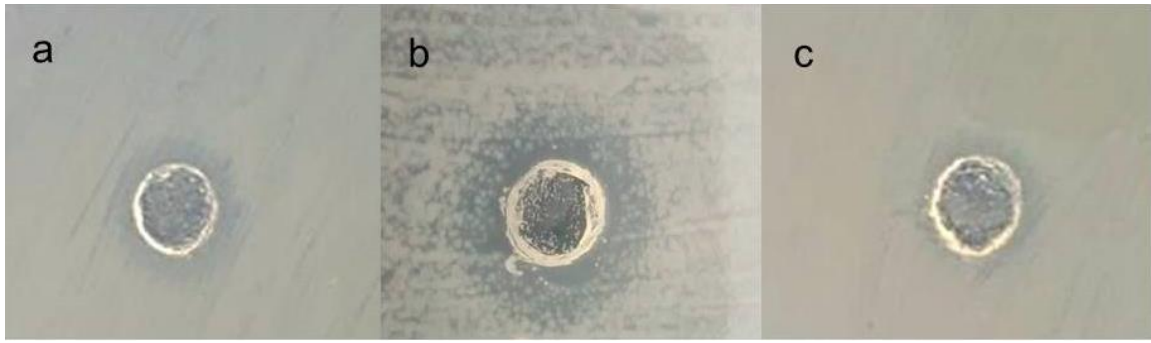


579 Figura 3a-d



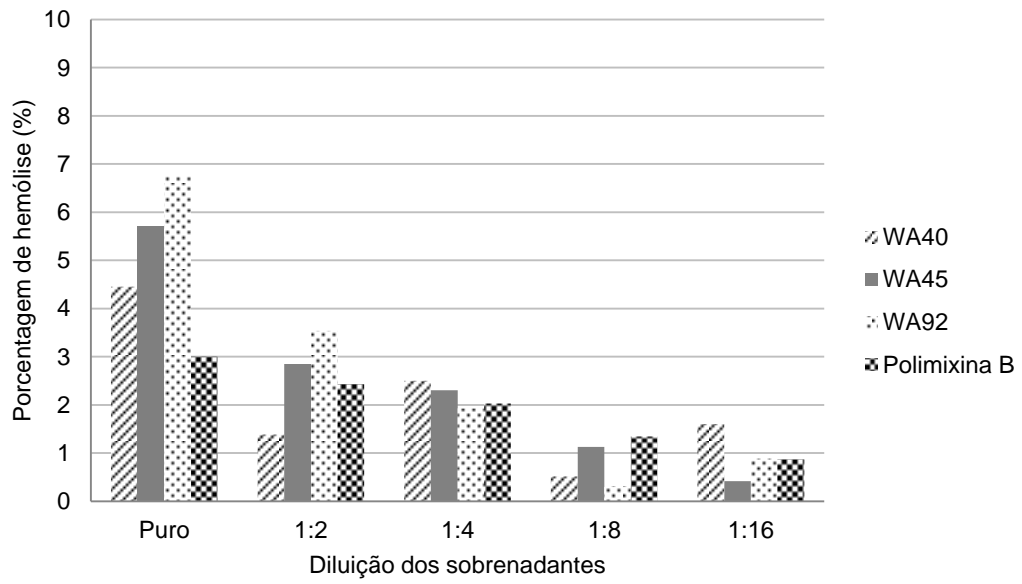
580
581
582

Figura 4a-c.



583
584
585

Figura 5a-c.



586

587

588 **Figura 6**

589 CONSIDERAÇÕES FINAIS

590

591 Este estudo evidencia o potencial antibiótico de micocinas de
592 *Wickerhamomyces anomalus*, que em testes em meio líquido e sólido, mostrou
593 combater *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Além disso, constatou-se que sua
594 ação é rápida e de baixa toxicidade.

595 Com este projeto, almejamos futuramente o desenvolvimento de um
596 medicamento antibiótico via tópica a base de micocinas de *W. anomalus*, cepas
597 WA40, WA45 e WA92.