



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA LARISSA NASCIMENTO

**INIBIÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE POR MICOCINAS
PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus***

ORIENTADOR: PROF. DR. RINALDO FERREIRA GANDRA

**CASCAVEL – PR
2019**

BRUNA LARISSA NASCIMENTO

**INIBIÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE POR MICOCINAS
PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus***

**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

**CASCAVEL – PR
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Nascimento, Bruna Larissa Inibição de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* / Bruna Larissa Nascimento; orientador(a), Rinaldo Ferreira Gandra, 2019.
64 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Microbiologia. 2. Micocinas. I. Gandra, Rinaldo Ferreira. II. Título.

Dissertação revisada conforme as normas de redação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por Liamar Maximiliano Barbosa, RG 4.010.653-7, revisor habilitado, graduado em Letras pela Universidade do Oeste do Paraná.

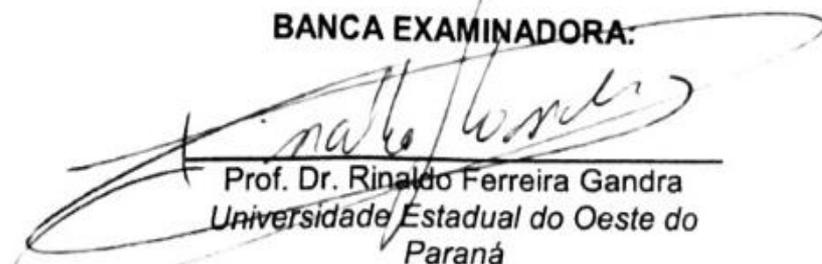
BRUNA LARISSA NASCIMENTO

**INIBIÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE POR MICOCINAS
PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus***

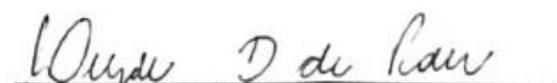
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

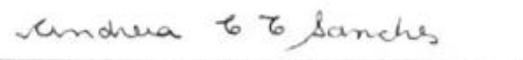
BANCA EXAMINADORA:



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



Prof. Dra. Leyde Daiane de Peder
Centro Universitário da Fundação Assis
Gurgacz
FAG



Prof. Dra. Andréia Cristina Conegero
Sanches
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

**Cascavel - PR
2019**

BRUNA LARISSA NASCIMENTO

BIOGRAFIA RESUMIDA

Bruna Larissa Nascimento, natural de Laranjeiras do Sul, Paraná, Brasil, nascida no dia 07 de julho de 1994, graduada em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em abril de 2017. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2017. 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.

A Deus,
À minha família

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ser minha força e amparo nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Maria Elena e Parailio, que sempre me apoiaram. Obrigada pelo ombro amigo, pelo colo, por brindarem minhas conquistas e sempre me incentivarem a continuar. Vocês são meus maiores exemplos de humildade e honestidade. Sou imensamente grata por tudo, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Agradeço ao meu parceiro de vida, Pedro, que sempre me incentivou e me ajudou na realização dos meus sonhos, compreendendo a ausência e angústia de dias conturbados e sempre me mostrando o lado positivo de tudo.

Aos meus avós, Geny, João e Olavio que apesar de não estarem presentes fisicamente foram anjos em toda essa caminhada. Agradeço também a vó Olga por toda preocupação, carinho e torcida nestes dois anos.

Aos meus colegas de trabalho, os quais se tornaram grandes amigos, Daniele, Mateus, Lana, Aline, Juliane e Gabrielle que me ajudaram a realizar este trabalho e alegraram meus dias no laboratório.

Agradeço à minha colega de mestrado, Débora, minha amiga de todas as horas com quem compartilhei minhas inseguranças e que sempre esteve pronta para me ajudar. Obrigada por tudo e conte comigo.

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

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

INIBIÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE POR MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus*

RESUMO

O sistema *killer* consiste na secreção de micocinas por leveduras *killer*. Estas substâncias demonstram potencial de afetar micro-organismos que são sensíveis. *Wickerhamomyces anomalus* é uma levedura produtora de micocinas alvo de estudos em diferentes áreas, incluindo meio ambiente, indústria e ciências médicas. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase está em destaque devido ao seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Devido à essa problemática de bactérias multirresistentes, novas alternativas de tratamentos vêm sendo estudadas. Dentre elas, encontram-se as micocinas, estas já demonstraram efetividade na inibição de diversos fungos e bactérias. Este trabalho tem como objetivo verificar a inibição de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. Realizou-se determinação de β -glucanases, ensaios de microdiluição em meio líquido e sólido e teste de hemólise. O sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* mostrou atividade de β -glucanases de 2,36 U/mg. Resultados evidenciaram atividade antimicrobiana em 100% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase até a concentração de 0,12 U/mg, sendo que na concentração de 0,06 U/mg 36,7% das cepas foram inibidas e na concentração de 0,03 e 0,02 U/mg 3,3% das cepas foram susceptíveis às micocinas. Além disso, o teste de hemólise mostrou baixa citotoxicidade das micocinas, sendo encontrado 5,4% de hemólise na concentração de 1,18 U/mg, concentração superior às concentrações capazes de inibir 100% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Sendo assim, podemos notar o potencial das micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas.

Palavras chaves:

Atividade antimicrobiana; toxina *killer*; resistência bacteriana.

INHIBITION OF *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE BY PRODUCED MYCOCIN BY *Wickerhamomyces anomalus*

ABSTRACT

The killer system consists of killer yeast secretion of mycocins. These substances have the potential to affect other sensitive microorganisms. *Wickerhamomyces anomalus* is a yeast that produces mycocins target of studies in different areas, including the environment, industry and medical sciences. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase is highlighted by antimicrobial resistance profile. Due to this problem of multiresistant bacteria, new treatments alternatives have been studied. Among them are the mycocins, these have already demonstrated effectiveness in the inhibition of diverse fungi and bacteria. This work aims to verify the inhibition of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase by mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus*. β -glucanases were determined, microdilution assays in liquid and solid medium and haemolysis test. *Wickerhamomyces anomalus* supernatant showed β -glucanase activity of 2.36 U/mg. Results showed antimicrobial activity in 100% of strains of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase up to the concentration of 0.12 U/mg. At the concentration of 0.06 U/mg, 36.7% of the strains were inhibited and at a concentration of 0.03 and 0.02 U/mg 3.3% of the strains were susceptible to mycocins. In addition, the hemolysis test showed low cytotoxicity of the mycocins, with a concentration of 1.18 U/mg 5.4% concentration higher than the concentrations capable of inhibiting 100% of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase strains. Thus, we can note the potential of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins in the development of new antimicrobial substances.

Keywords:

Antimicrobial activity; killer toxin; Bacterial resistance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
Objetivo geral	2
Objetivos específicos	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Leveduras <i>Killer</i> e <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	7
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1	18
Inibição de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase por micocinas produzidas por <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	19
Revista: <i>Journal of Medical Microbiology</i> : Qualis/Capes em Farmácia: B1	19
CAPÍTULO 2	38
Micocinas: um grande potencial para aplicação em saúde	39
Revista: <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> Qualis/Capes em Farmácia: B2	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da parede celular de três diferentes classes de microrganismos patogênicos	5
Figura 2 Mecanismos de resistência bacteriana	8

INTRODUÇÃO

O fenótipo *killer* foi descoberto em *Saccharomyces cerevisiae* no ano de 1963 por Bevan e Makower. Desde então, outras leveduras são estudadas com o mesmo potencial. Este, se refere a capacidade de algumas leveduras secretarem uma substância conhecida como micocina ou toxinas *killer* que tem potencial de afetar outras leveduras ou micro-organismos sensíveis.

Wickerhamomyces anomalus (*W. anomalus*) é uma levedura amplamente distribuída no ambiente, com vasto potencial biotecnológico e altamente competitivo em muitos habitats, pois é adaptável a diversas condições de crescimento, como por exemplo condições extremas de pH, temperatura e osmolaridade. Em relação a sua aplicabilidade, melhora o sabor, a textura, o rendimento e a segurança dos produtos agrícolas por competição com fungos indesejáveis e por esse motivo é estudada por diversos pesquisadores de diferentes áreas, incluindo meio ambiente, indústria e ciências médicas.

Uma característica da levedura de *W. anomalus* é sua atividade antimicrobiana contra uma variedade de espécies de fungos e bactérias, por mecanismos de biossíntese de compostos voláteis ou mediada por micocinas. Devido a ação das micocinas em glucanos, um importante polímero na membrana da célula fúngicas e bacterianas e não está presente em células mamíferas, o mecanismo torna-se seletivo.

As bactérias conhecidas como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) estão em destaque na atualidade. Estas são bactérias gram-negativas da família das *Enterobacteriaceae* e são capazes de produzir a enzima carbapenemase, que confere resistência aos antimicrobianos, tais como carbapenêmicos e β -lactâmicos. A KPC foi descoberta em 1996 nos Estados Unidos, sendo relatada em 2001 e a primeira cepa foi relatada no Brasil em 2006, e vêm se tornando uma preocupação emergente quanto à saúde pública mundial, pois disseminou-se rapidamente por outras regiões com altas taxas de mortalidade entre pacientes com infecções causadas por esses organismos. Vale lembrar que apesar de maior ocorrência em *Klebsiella pneumoniae*, a carbapenemase pode ser identificada em outras bactérias.

Devido a constante preocupação em relação a resistência bacteriana desenvolvida sobre a atuação antibiótica, ressalta-se o pioneirismo deste trabalho que visa a inibição da KPC através da utilização de micocinas produzidas de *W. anomalus*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a inibição de cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*.

Objetivos específicos

- Obter o sobrenadante de cultura de *Wickerhamomyces anomalus* WA92;
- Dosar a quantidade de β -glucanase no sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* WA92;
- Verificar a formação de zona de inibição e também inibição em meio sólido da cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705.
- Testar as cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase frente ao sobrenadante contendo as micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 pelo método de microdiluição em meio líquido.
- Avaliar a atividade hemolítica das micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA92.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Leveduras *killer* e *Wickerhamomyces anomalus*

As leveduras *killer* secretam micocinas, também conhecidas como toxinas *killer*, que são letais para outras cepas de leveduras. São imunes à sua própria toxina, mas permanecem susceptíveis às toxinas de outras leveduras. São caracterizadas por serem de natureza proteica ou glicoproteica, de baixo peso molecular e demonstram potencial de afetar outros microrganismos sensíveis (SCHMITT; BREINIG, 2002; TAY; LIM; TAN, 2014).

O fenômeno *killer* de leveduras deriva da atividade letal de micocinas secretadas por cepas, as quais são imunes a sua própria toxina, expressando receptores específicos na parede celular (CAPPELLI *et al.*, 2014). Estas podem ser aplicadas para o controle biológico, fermentação e indústrias farmacêuticas (SUN *et al.*, 2012).

Este comportamento foi observado pela primeira vez por Bevan e Makower, em 1963, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de contaminante de cervejaria. Neste estudo, foi demonstrado que células sensíveis em meio de cultura juntamente com células *killer* morriam em sua grande parte, enquanto as células neutras não tinham nenhuma ação. Esse fenômeno ocorre devido à secreção de substâncias denominadas micocinas ou toxinas *killer*. Com isto, classificou-se a ocorrência de três fenótipos distintos de leveduras: *killer*, sensível e neutro (BEVAN; MAKOWER, 1963).

Outras leveduras passaram a ser estudadas e identificadas com o mesmo potencial, como leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Wickerhamomyces*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (SCHMITT; BREINIG, 2002; TAY; LIM; TAN, 2014).

O reino Fungi inclui uma variedade de espécies de leveduras biotecnologicamente importantes, sendo um dos representantes o *W. anomalus*, anteriormente conhecido como *Pichia anomala* e *Hansenula anomala* (SCHNEIDER *et al.*, 2012; TAY; LIM; TAN, 2014). *W. anomalus* é uma levedura heterotática que se reproduz assexualmente por brotação e sexualmente pela formação de ascósporos em forma de chapéu (SATORA *et al.*, 2014). Além disso, foi a primeira levedura descoberta a ser capaz de inibir o crescimento de organismos eucariotos e procariotos patogênicos (POLONELLI *et al.*, 1986; POLONELLI *et al.*, 2011).

Em 1995, houve relato de infecção oportunista, levando alguns pesquisadores a considerar *W. anomalous* um patógeno emergente. Contudo, na primeira década do século XX, menos de dez relatos publicados tratavam de infecções causadas por esta levedura, sendo considerada de baixa virulência (HAZEN, 1995; PASSOTH; OLSTORPE; SCHNURER, 2011). *W. anomalous* é segura para indivíduos saudáveis, segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), recebendo o status de *Qualified Presumption of Safety* (QPS) como micro-organismo de nível de biossegurança 1, demonstrando benefícios em relação às perspectivas públicas de biotecnologia alimentar e aceitabilidade de novos micro-organismos em alimentos (SUNDH; MELIN, 2011; WALKER, 2011; MUCCILLI *et al.*, 2013).

Uma característica importante das leveduras de *W. anomalous* é sua alta atividade antimicrobiana, possuindo atividade contra uma variedade de micro-organismos incluindo outras leveduras, fungos e bactérias. Essa atividade pode ser relacionada à biossíntese de compostos voláteis, como acetato de etila, acetato de isoamila e propionato de etila ou pode ser mediada por micocinas (WALKER, 2011).

O mecanismo de ação das micocinas é frequentemente atribuído à hidrólise de β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano, e como este é o principal polímero de células fúngicas e também é encontrado em bactérias, gera danos na parede celular, vazamento dos componentes citoplasmáticos e conseqüentemente morte celular (**Figura 1**). O glucano é um importante polímero na membrana das células de fungos e bactérias, e não está presente em células mamíferas, tornando o mecanismo seletivo (IZGU; ALTINBAY; TURELI, 2007; IZGU; KEPEKCI; IZGU, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2012; MUCCILLI *et al.*, 2013).

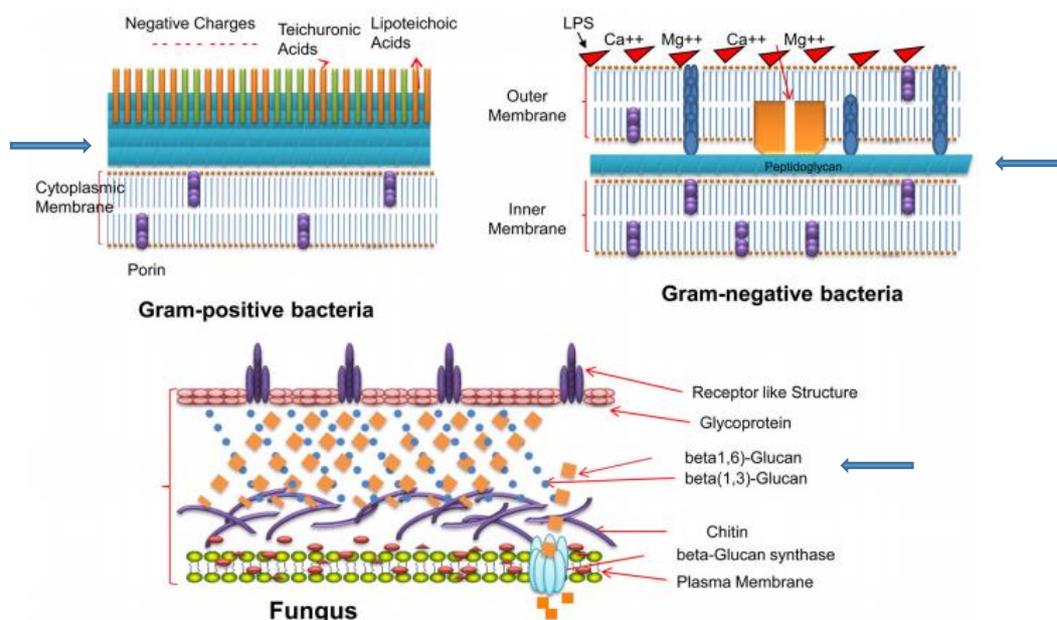


Figura 1 Estrutura da parede celular de três diferentes classes de microrganismos patogênicos (DAÍ; YING-YING; HAMBLIN, 2009).

Pesquisas anteriores mostraram inibição de *Botrytis cinerea* atribuída à hidrólise de β -1,3-glucano (FRIEL *et al.*, 2007); inibição de *Penicillium* e *Aspergillus* relacionada à biossíntese de compostos voláteis (PETERSSON; SCHNURER, 1995; FREDLUND *et al.*, 2004); *Candida albicans* (PARIS *et al.*, 2016); e inibição de *Enterobacteriaceae*, sendo o mecanismo de inibição bacteriana ainda desconhecido (OLSTORPE *et al.*, 2010; PASSOTH; OLSTORPE; SCHNURER, 2011). A atividade antimicrobiana é uma característica das cepas de *W. anomalus* relevante para a melhoria dos processos da indústria (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

W. anomalus possui vasto potencial biotecnológico e é altamente competitivo em muitos habitats, já tendo sido isolada de diferentes fontes, incluindo pele de frutas, plantas com flores, produtos lácteos e assados, óleo contaminado, alimentos salgados, águas residuais, ambientes marinhos, tecidos humanos e até intestino de insetos como moscas, besouros e mosquitos (WALKER, 2011; HUA *et al.*, 2015).

Esta característica deve-se ao fato de que a levedura é tolerante às condições extremas de estresse ambiental, conseguindo desenvolver-se em diversas fontes contendo carbono, nitrogênio e fósforo, pH baixo e alto, baixa atividade da água, alta pressão osmótica e baixas concentrações de oxigênio. Bem como é adaptada a uma vasta gama de condições de crescimento, em termos de temperatura (variando de 3 até 37°C), valor de pH (2-12) e osmolaridade (WALKER, 2011; OLSTORPE; PASSOTH, 2011; SATORA *et al.*, 2014).

W. anomalus têm a capacidade de utilizar com rapidez os nutrientes disponíveis e de sustentar uma série de condições extremas, se tornando ferramentas biotecnológicas úteis, em particular na indústria alimentar. É utilizada como conservante natural, em fermentações, sendo o biocontrole a aplicação mais estudada da espécie (MUCCILLI *et al.*, 2013). Alguns estudos descrevem que cepas de *W. anomalus* foram capazes de atuar como agentes de biocontrole, apresentando perfil competitivo para inibir uma ampla variedade de outros micro-organismos (SCHNURER; JONSSON, 2011; OLSTORPE; PASSOTH, 2011; JIJAKLI, 2011; PASSOTH; OLSTORPE; SCHNURER, 2011).

Em relação a aplicabilidade de *W. anomalus*, sabe-se que esta é conhecida por melhorar o sabor, a textura, o rendimento e a segurança dos produtos agrícolas por competição com fungos indesejáveis. Portanto, vem sendo alvo de pesquisadores de diferentes áreas, incluindo meio ambiente, indústria e ciências médicas (OLSTORPE; PASSOTH, 2011; JIJAKLI, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2012).

Entre as aplicações, encontram-se: biocontrole de fungos deteriorantes e/ou micotoxigênicos em alimentos, como em: grãos de cereais contaminados com aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus* (CODA *et al.*, 2011; HUA *et al.*, 2015), frutas (LIMA *et al.*, 2013) e processos de biopreservação e fermentação de produtos láteos (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Além disso, o fato da maioria das leveduras não serem patogênicas e se adaptarem facilmente às condições ambientais faz com que estas sejam utilizadas para controle biológico de alimentos e alternativa aos fungicidas para fungos pós-colheita (OLSTORPE; PASSOTH, 2011).

W. anomalus é utilizado para a biopreservação do grão de cereais inoculados (OLSTORPE; PASSOTH, 2011); otimização da produção de bebidas, entre elas: cerveja (LAITILA *et al.*, 2011); e vinho (SWANGKEAW *et al.*, 2011; SATORA *et al.*, 2014; SCHWENTKE *et al.*, 2014); e na melhoria na produção de bioetanol (PASSOTH *et al.*, 2009). Ruyters *et al.* (2015) e Zha *et al.* (2013) também sugeriram que *W. anomalus* pode ser um interessante candidato para a fermentação de xilose em hidrolisados lignocelulósicos na produção de etanol. Outras aplicações com potencial biotecnológico incluem a biorremediação ambiental, biofármacos e biocombustíveis (POLONELLI *et al.*, 2011; WALKER, 2011; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2012). Quando comparada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o metabolismo aeróbico de *W. anomalus* não é reprimido em altas concentrações de açúcar (SCHWENTKE *et al.*, 2014).

No campo da medicina, a levedura de *W. anomalous* foi utilizada no desenvolvimento de novos antimicóticos para o tratamento de infecções fúngicas humanas e animais e na biotopografia de leveduras patogênicas e fungos. O mecanismo de inibição bacteriana ainda é desconhecido, mas é provável que *W. anomalous* desempenhe papel principal, como já demonstrado em diferentes bactérias e fungos (CAPPELLI *et al.*, 2014).

Estudos também indicam que as leveduras produtoras de micocinas habitam o intestino de alguns vetores, como *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e também *Anopheles stephensi*, vetor da malária, sendo possível utilizar levedura como ferramenta para controle simbiótico da doença, podendo ser um meio alternativo para lutar contra doenças infecciosas, de forma a reduzir ou eliminar o vetor (RICCI *et al.*, 2011; CAPPELLI *et al.*, 2014; VALZANO *et al.*, 2016).

As micocinas também podem ser utilizadas como marcador epidemiológico de leveduras através do método conhecido como sistema *Killer*, preconizado por Polonelli *et al.* 1983. O método baseia-se na sensibilidade de cepas de *Candida albicans* frente às micocinas produzidas por 9 espécies pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula* (POLONELLI *et al.*, 1983).

Polonelli *et al.* (2014) usaram um anticorpo monoclonal em camundongos imitando a atividade *killer* de *W. anomalous* e identificaram a possibilidade de desenvolver vacinas utilizando o mesmo mecanismo de ação das micocinas, com ação sobre a parede de β - 1,3-glucano. Relatos também mostram que as leveduras têm capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos no sistema gastrointestinal (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2013).

Um estudo realizado com uma cepa de toxina *killer* de *W. anomalous*, isolada do vetor da malária, mostrou que o pH não é um fator limitante, pois é ativo na faixa de 4,5 até 8,0 (CAPPELLI *et al.*, 2014). Além disso, as micocinas mostram baixa probabilidade de indução a resistência e não são consideradas hemolíticas, mostrando assim seu potencial para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (POLONELLI *et al.*, 1983; IZGU; ALTINBAY; TURELI, 2007; IZGU; KEPEKCI; IZGU, 2011; MUCCILLI *et al.*, 2013; BAJAJ; RAINA; SINGH, 2013; SEDDIK *et al.*, 2016; PARIS *et al.*, 2016).

***Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Nas últimas décadas têm-se observado a proliferação de bactérias patogênicas multirresistentes. As bactérias produtoras da enzima carbapenemase, estão em

destaque, sendo chamadas de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), isto porque foram encontradas inicialmente nessa bactéria. Embora mais frequente na *Klebsiella pneumoniae*, a KPC pode ser identificada em outras bactérias, como: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012).

São bactérias gram-negativas e capazes de produzir carbapenemase, uma enzima que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos: meropenem, ertapenem, imipenem. Também inativam os agentes β -lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam (KITCHEL *et al.*, 2009; SPANU *et al.*, 2012; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Outros mecanismos de resistência são: alteração na permeabilidade da membrana celular, impedindo a entrada do antibiótico na célula; mutação genética, alterando o alvo do antibiótico; capacidade de degradar ou inativar o antibiótico e bombeamento do antibiótico para fora da mesma, pelo mecanismo de efluxo (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012) (**Figura 2**).

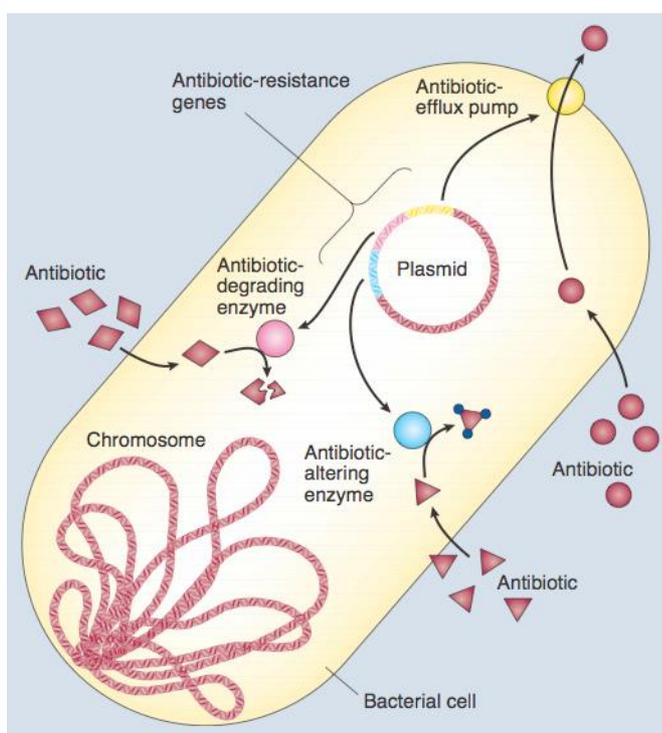


Figura 2 Mecanismos de resistência bacteriana (LEVY; MARSHALL, 2004).

A KPC foi descoberta em 1996, sendo seu primeiro relato em 2001, no estado da Carolina do Norte, nos Estados Unidos. Já no Brasil, as primeiras cepas foram encontradas em 2006 em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em um hospital de Pernambuco. Após descoberta, a KPC rapidamente disseminou-se por outras regiões, no entanto, sua epidemiologia e características clínicas variam. Recentemente, tornou-se uma preocupação emergente para a saúde pública mundial,

havendo uma alta mortalidade entre pacientes com infecções causadas por esses organismos (YIGIT *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2009; TSAKRIS *et al.*, 2009; CAI *et al.*, 2012; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015).

Segundo Kitchel *et al.* (2009) os relatórios indicaram que essas bactérias já são amplamente distribuídas, sendo que os isolados de *Enterobacteriaceae* que produzem KPC já foram identificados em outros locais do Estados Unidos e também relatados em outros países, como Brasil, China, Colômbia, França, Grécia, Israel, Noruega, Escócia e Suécia.

Os fatores responsáveis pela disseminação de bactérias produtoras de carbapenemase são vários e de difícil controle. Entre eles, o principal é o alto consumo de antibióticos carbapenêmicos. Outros fatores incluem: disseminação descontrolada no ambiente hospitalar e comunidade e outros fatores ainda desconhecidos (HRABÁK; CHUDACKOVA; PAPAGIANNITSIS, 2014).

A KPC é da família *Enterobacteriaceae*, considerada um importante patógeno comunitário e hospitalar, podendo causar grande variedade de infecções, desde urinárias, gastroenterites e pneumonias até meningite e septicemia. Essas infecções estão associadas a uma mortalidade significativa por motivos como: doenças subjacentes, atrasos na iniciação de terapia eficaz e falta de eficácia de antimicrobianos (HRABÁK; CHUDACKOVA; PAPAGIANNITSIS, 2014).

As carbapenemases mais prevalentes em *Enterobacteriaceae* são codificadas por genes dos grupos *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXa}* (NORDMANN; GIRLICH; POIREL, 2012). Estes genes, como o *bla_{KPC}*, são plasmídeos transmissíveis entre *Enterobacteriaceae*, e por estarem localizados em um plasmídeo móvel, podem ser facilmente transferidos entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes. Assim, a KPC apresenta um alto potencial de disseminação e grande capacidade de transferir seu material genético, e conseqüentemente, os genes de resistência (MARSCHALL *et al.*, 2009; DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012).

Tavares *et al.* (2015) realizaram um estudo com amostras clínicas de 11 estados brasileiros e do Distrito Federal e observaram a presença de KPC em outras nove espécies. Além de *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* e *Serratia marcescens* também já foram observadas no Brasil em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (JACOME *et al.*, 2012) e *Pseudomonas putida* (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Outro fator importante é que os plasmídeos que contêm o gene *bla_{KPC}*, normalmente transportam genes que também codificam resistência aos aminoglicosídeos, sulfas e fluorquinolonas (SHENG *et al.*, 2012). Portanto, o tratamento de pacientes com essas infecções torna-se complicado e sem alternativas (TUMBARELLO *et al.*, 2012).

Atualmente, os principais desafios são o reconhecimento precoce e preciso de pacientes portadores de cepas com enzimas carbapenemase. É de extrema importância o reconhecimento imediato destes isolados e o apropriado controle de infecção deve ser implementado para prevenir a propagação (SPANU *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2015). Testes fenotípicos, como teste de Hodge, podem detectar a resistência mediada pela KPC, mas não confirmam definitivamente a natureza do gene da carbapenemase. O padrão ouro para identificar genes *bla_{KP}* é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), porém essa abordagem tem um alto custo e requer considerável conhecimento técnico (SPANU *et al.*, 2012).

Sendo assim, a técnica descrita por Hodge *et al.* é um dos métodos mais utilizados (HODGE; CIAK; TRAMONT, 1978). Apesar dos problemas com a interpretação do mesmo e os resultados falso-negativos para alguns isolados, o CLSI propôs este teste para confirmação de produtores de carbapenemase (CLSI, 2010; HRABÁK; CHUDACKIVA; PAPAGIANNITSIS, 2014). Estudo realizado em 2012 também mostrou que o teste é uma ferramenta fenotípica e epidemiológica útil para identificar isolados de KPC (CURY *et al.*, 2012).

Em relação ao tratamento, os carbapenêmicos são considerados a primeira opção terapêutica para o tratamento de infecções graves associadas às bactérias Gram-negativas multirresistentes. A produção de carbapenemases adquiridas torna a escolha do tratamento antibiótico dessas infecções limitada (MONTEIRO *et al.*, 2009; CAI *et al.*, 2012; HRABÁK; CHUDACKIVA; PAPAGIANNITSIS, 2014). Além disso, apenas algumas drogas estão em desenvolvimento contra a KPC (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013).

A terapia para infecções por enterobactérias multirresistentes se baseia na utilização de polimixina B ou polimixina E (Colistina) em associação com um ou mais dos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) e/ou tigeciclina (ANVISA, 2013). Uma grande preocupação é o surgimento de KPC resistente aos antimicrobianos citados acima. Estas provavelmente resultam do uso intenso e crescente de drogas, incluindo o uso em áreas onde a KPC se espalhou (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013).

Novas alternativas vêm sendo estudadas e são urgentemente necessárias. Estas, ao contrário dos antimicrobianos convencionais, podem ser direcionadas para bactérias específicas de modo a evitar a seleção de bactérias resistentes. São exemplos dessas terapias: utilização de fagos com capacidade lítica contra bactérias específicas; uso de bacteriocinas, que são pequenos peptídeos sintetizados por bactérias e possuem capacidade de inibir o crescimento de espécies estritamente relacionadas, através da inserção na membrana plasmática das bactérias alvo formando poros e causando lise; e uso de bactérias predatórias, como por exemplo, *Bdellovibrio* sp. e organismos relacionados, que predam obrigatoriamente bactérias Gram-negativas para buscar energia e nutrientes, através da utilização de um arsenal enzimático (ALLEN *et al.*, 2014).

Neste contexto, as micocinas produzidas de *W. anomalus* também podem ser uma alternativa efetiva contra micro-organismos patogênicos e resistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a inibição de cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Nota técnica nº 01/2013, medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Acesso em: 18 de Agosto de 2018.

ALLEN, H.K.; TRACHSEL, J.; LOOFT, T.; CASEY, T.A. Finding alternatives to antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1323, n. 1, p. 91–100, 2014.

ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; CAVALCANTI, F.L.S.; MARTINS, W.M.B.S.; MORAIS, M.A.; JR; MORAIS, M.M.C.; First description of KPC-2-producing *pseudomonas putida* in brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 4, p. 2205–2206, 2012.

BAJAJ, B.K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 645-656, 2013.

BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the 11th International Congress on Genetics**, Netherlands, v. 1, p. 202–203, 1963.

CAI, J.C.; YANG, W.; HU, Y.Y.; ZHANG, R.; ZHOU, H.W.; CHEN, G. Detection of KPC-2 and qnrS1 in clinical isolates of *Morganella morganii* from China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 73, n. 2, p. 207–209, 2012.

CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; EPIS, S.; GABRIELLI, M.G.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; BANDI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 5, 2014.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20-U. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2010.

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**, Washington v. 77, n. 10, p. 3484–3492, 2011.

COTRIM, E.R.; ROCHA, R.D.R.; FERREIRA, M.F.R. KPC em Enterobacteriaceae : o desafio das bactérias multirresistentes. **Pós Em Revista Do Centro Universitário Newton Paiva**, Belo Horizonte, n. 5, p. 268–275, 2012.

CURY, A.P.; ANDREAZZI, D.; MAFFUCCI, M.; CAIAFFA-JUNIOR, H.H.; ROSSI, F. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *klebsiella pneumoniae carbapenemase*. **Clinics, São Paulo**, v. 67, n. 12, p. 1427–1431, 2012.

DAI, T.; YING-YING, H.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. **Photodiagn Photodyn Ther**, v. 6, n. 3-4, p.170-188, 2009.

DEL-PELOSO, P.F.; BARROS, M.F.L.; SANTOS, F.A. Sepse por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 365–367, 2010.

FERNÁNDEZ, P.M.; MARTORELL, M.M.; FARIÑA, J.I.; FIGUEROA, L.I.C. Removal Efficiency of Cr⁶⁺ by Indigenous *Pichia* sp. Isolated from Textile Factory Effluent. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, p. 1–6, 2012.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.A.; OLSTORPE, M.N.; PASSOTH, V.; SCHNÜRER, J. Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 133–137, 2004.

FRIEL, D.; PESSOA, N.M.G.; VANDENBOL, M.; JIJAKLI, M.H. Separate and combined disruptions of two exo-beta-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. **Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI**, v. 20, n. 4, p. 371–379, 2007.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 5, p. 8-17, 2013.

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

HODGE, W.; CIAK, J.; TRAMONT, E. C. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 7, n. 1, p. 102–103, 1978.

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 of Microbiology and Biotechnology**, Durham, v. 31, n. 5, p. 729–734, 2015.

HRABÁK, J.; CHUDÁČKOVÁ, E.; PAPAGIANNITSIS, C. C. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 839–853, 2014.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; TÜRELI, A. E. In vitro activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCCY 434, against dermatophytes. **Mycoses**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 31–34, 2007.

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- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCCY 434. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 85–91, 2011.

JACOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.

JIJAKLI, M.H. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 93–105, 2011.

KITCHEL, B.; RASHEED, J.K.; PEREIRA, J.B.; SRINIVASAN, A.; VENEZIANAVON, S.; CARMELI, Y.; BROLUND, A.; GISKE, C.G. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 8, p. 3365–3370, 2009.

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**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 75–84, 2011.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v.10, n.12, p.122–129, 2004.

LIMA, J.R.; GONDIM, D.M.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, F.S.A.; GONÇALVES, L.R.B.; VIANA, F.M.P. Use of *killer* yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 58–64, 2013.

MARSCHALL, J.; TIBBETTS, R.J.; DUNNE, W.M.; FRYE, J.G.; FRASER, V.J.; WARREN, D.K. Presence of the KPC carbapenemase gene in enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 239–241, 2009.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

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

MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, R.A.; SCHWABER, M.J.; DAIKOS, G.L.; CORMICAN, M.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M.K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D.M.; MAYA, J.J.; NORDMANN, P.; PATEL, J.B.; PATERSON, D.L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M.V.; EANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J.P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, London, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2761–2766, 2012.

OLSTORPE, M.; BORLING, J.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 156, n. 1–2, p. 47–56, 2010.

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

PARIS, A.P.; PERSEL, C.; SERAFIN, C.F.; SIMÃO, R.C.G.; GANDRA, R.F. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p.878-884, 2016.

PASSOTH, V.; ERIKSSON, A.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; PIENS, K.; SCHNÜRER, J. Airtight storage of moist wheat grain improves bioethanol yields. **Biotechnology for Biofuels**, Berlin, v. 2, n. 1, p. 16, 2009.

PASSOTH, V.; OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 121–125, 2011.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1027–1032, 1995.

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.; BERNARDIS, F.; MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast *killer* toxin. **Mycopathologia**, The Hague, v. 107, 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**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 35–41, 2011.

POLONELLI, L.; BENINATI, C.; TETI, G.; FELICI, F.; CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; SPERINDE, M.; LO PASSO, C.; PERNICE, I.; DOMINA, M.; ARIGO, M.; PAPASERGI, S.; MANCUSO, G.; CONTI, S.; MAGLIANI, W. Yeast killer toxin-like candidacidal Ab6 antibodies elicited through the manipulation of the idiotypic cascade. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. 105727, 2014.

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.

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**, Houndmills, 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**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 729–740, 2014.

SEDDIK, H.A.; CEUGNIEZ, A.; BENDALI, F.; CUDENNEC, B.; DRIDER, D. Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans* *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives Microbiology**, v. 198, p.71-81, 2016.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral *killer* system in yeast: From molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 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**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 382–386, 2012.

SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. *Pichia anomala* J121: A 30-year overnight near success biopreservation story. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 5–12, 2011.

SCHWENTKE, J.; SABEL, A.; PETRI, A.; KÖNIG, H.; CLAUS, H. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* AS1 secretes a multifunctional exo-beta-1,3-glucanase with implications for winemaking. **Yeast**, Chichester, v. 31, p. 349-59, 2014.

SEDDIK, H.A.; CEUGNIEZ, A.; BENDALI, F.; CUDENNEC, B.; DRIDER, D. Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans* *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives Microbiology**, v. 198, p.71-81, 2016.

SHENG, J. F.; LI, J.J.; TU, S.; SHENG, Z.K.; BI, S.; ZHU, M.H.; SHEN, X.M.; LI, L.J. blaKPC and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 31, n. 7, p. 1585–1591, 2012.

SPANU, T.; FIORI, B.; D'INZEO, T.; CANU, G.; CAMPOLI, S.; GIANI, T.; PALUCCI, I.; TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; ROSSOLINIC, G.M. Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (blaKPC). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2783–2785, 2012.

SUN, H.Y.; WANG, K.; CHI, Z.; XU, H.M.; CHI, Z.M. Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. **Process Biochemistry**, London, v. 47, n. 2, p. 251–256, 2012.

SUNDH, I.; MELIN, P. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 113–119, 2011.

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**, Durham, v. 27, n. 2, p. 423–430, 2011.

TAVARES, C.P.; PEREIRA, P.S.; MARQUES, E.A.; JR, C.F.; SOUZA, M.P.A.H.; ALMEIDA, R.; ALVES, C.F.M.; ASENSI, M.D.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (*non-Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 82, n. 4, p. 326–330, 2015.

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**, London, v. 14, p. 439, 2014.

TSAKRIS, A.; KRISTO, L.; POULOU, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; IKONOMIDIS, A.; PETROPOULOU, D.; POUMARAS, S.; SOFIANOU, D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 362–367, 2009.

TUMBARELLO, M.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; TRECARI, E.M.; TUMIETTO, F.; MARCHESE, A.; SPANU, T.; AMBRETTI, S.; GINOCCHIO, F.; CRISTINI, F.; LOSITO, A.R.; TEDESCHI, S.; CAUDA, R.; BASSETTI, M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 55, n. 7, p. 943–950, 2012.

VALZANO, M., CECARINI, V., CAPPELLI, A., CAPONE, A., BOZIC, J., CUCCIOLONI, M., EPIS, S., PETRELLI, D., ANGELETTI, M., ELEUTERI, A.M., FAVIA, G. E RICCI, I. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. **Malaria Journal**, n. 2, 2016.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 25–34, 2011.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G.F.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, F.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

ZHA, Y.; HOSSAIN, A.H.; TOBOLA, F.; SEDEE, N.; HAVEKES, M.; PUNT, P.J. *Pichia anomala* 29X: A resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 13, n. 7, p. 609–617, 2013.

CAPÍTULO 1

**INIBIÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE POR MICOCINAS
PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus***

Bruna Larissa Nascimento¹, Mateus Foltz Delabeneta¹, Lana Rubia B. Rosseto¹, Daniele S. B. Junges¹, Ana Paula Paris¹, Cristiane Persel¹ e **Rinaldo Ferreira Gandra¹**.

¹ University Hospital of Western Paraná, State University of Western Paraná, Avenida Tancredo Neves, 3224, Cascavel, Paraná 85806-470, Brazil.

Corresponding author:

Rinaldo Ferreira Gandra

ORCID: 0000-0001-9586-7253

+55 45 3321-5151

Email: rinaldo.gandra@unioeste.br

Palavras chaves:

Atividade antimicrobiana; toxina *killer*; resistência bacteriana, antibiótico.

Resumo:

Introdução: Devido à problemática de bactérias multirresistentes, novas alternativas de tratamentos vêm sendo estudadas. Dentre elas, as micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* mostram um grande potencial por possuírem alta atividade antimicrobiana contra uma variedade de micro-organismos, utilizarem com rapidez os nutrientes disponíveis e sustentar uma série de condições extremas. **Objetivo:** Verificar a inibição de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. **Metodologia:** Realizou-se a confirmação da produção de carbapenemase nas cepas estudadas e produção de caldo contendo micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* com posterior determinação de β -glucanases. Para avaliar a inibição das cepas foram realizados ensaios de microdiluição em meio líquido e testes em meio sólido. A toxicidade foi avaliada através de teste de hemólise e teste em *Artemia salina* Leach. **Resultados:** O sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* mostrou atividade de β -glucanases de 2,36 U/mg, sendo evidenciado atividade antimicrobiana em 100% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase até a concentração de 0,12 U/mg. Além disso, o teste de hemólise e teste em *Artemia salina* Leach mostraram baixa toxicidade. **Conclusão:** Sugere-se que as micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* podem ser uma alternativa no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas.

INTRODUÇÃO

As bactérias conhecidas como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são bactérias gram-negativas e capazes de produzir carbapenemase, uma enzima que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos: meropenem, ertapenem, imipenem e inativa os agentes β -lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam, aumentando as taxas de mortalidade, que podem chegar até 75%, já que existem poucas alternativas eficazes para o tratamento das mesmas [1-5].

Embora mais frequente na *Klebsiella pneumoniae*, a KPC pode ser identificada em outras bactérias, como: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* [6, 7]. São bactérias com alto potencial de disseminação e grande capacidade de transferir seu material genético, e conseqüentemente, os genes de resistência [7-10]. Os fatores responsáveis pela disseminação são vários e de difícil controle, sendo o principal deles o alto consumo de antibióticos carbapenêmicos. Outros fatores incluem a disseminação descontrolada no ambiente hospitalar e comunitário, além de outros fatores desconhecidos [11].

A disseminação mundial de KPC é uma ameaça para o tratamento com os antimicrobianos disponíveis atualmente [12]. Nenhum protocolo até o momento foi estabelecido e nenhum antibiótico atualmente disponível parece ser efetivo no tratamento de infecções com todos os tipos de carbapenemases [13]. Muitas vezes, somente polimixinas (colistina e polimixina B), tigeciclina, fosfomicina e alguns aminoglicosídeos possuem atividade *in vitro* [12, 14].

Segundo Munoz-price *et al.* [3] apesar da limitação do tratamento da KPC, apenas algumas drogas estão em desenvolvimento e são urgentemente necessárias. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), as ações fundamentais para enfrentar a KPC são: prevenção de infecções e de disseminação da resistência, monitoramento da resistência, prescrição apropriada de antimicrobianos e desenvolvimento de novos fármacos [15].

As micocinas, também conhecidas como toxinas *killer*, são substâncias secretadas por leveduras e caracterizadas por serem de natureza proteica ou glicoproteica, de baixo peso molecular e com potencial de afetar outros microrganismos sensíveis [16,17]. Este fenômeno foi observado pela primeira vez por Bevan e Makower, em 1963, em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* [18]. Outras leveduras passaram a ser estudadas, entre elas o *Wickerhamomyces anomalus*, (*W. anomalus*) anteriormente conhecido como *Pichia anomala* e *Hansenula anomala* [17,19].

W. anomalus é considerado seguro para indivíduos saudáveis, segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), recebendo o status de *Qualified Presumption of Safety* (QPS) como micro-organismo de nível de biossegurança 1 [20-22]. É uma ferramenta biotecnológica

útil por possuir alta atividade antimicrobiana, capacidade de utilizar com rapidez os nutrientes disponíveis além de sustentar uma série de condições extremas [22].

W. anomalus foi a primeira levedura descoberta a ser capaz de inibir o crescimento de organismos eucariotos e procariotos patogênicos [23,24]. Segundo Capelli *et al.* [25] apesar do mecanismo de inibição bacteriana ser desconhecido é provável que *W. anomalus* desempenhe papel principal.

O mecanismo de ação das micocinas é frequentemente atribuído à hidrólise de β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano e conseqüentemente morte celular. O glucano é um importante polímero na membrana das células de fungos e bactérias, e não está presente em células mamíferas, tornando o mecanismo seletivo [19, 22, 27, 28]. Além disso, as micocinas mostram baixa probabilidade de indução a resistência e não são consideradas hemolíticas, mostrando grande potencial para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos [27-31].

Devido a constante preocupação em relação a resistência bacteriana desenvolvida sobre a atuação antibiótica, ressalta-se o pioneirismo deste trabalho que tem como objetivo a inibição da KPC através da utilização de micocinas produzidas de *W. anomalus*.

MÉTODOS

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Foram utilizadas trinta cepas de bactérias produtoras de carbanemase, incluindo a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705. Destas, vinte e sete cepas tratavam de *Klebsiella pneumoniae*, duas cepas de *Enterobacter cloacae* e uma cepa de *Serratia marcescens*, todas produtoras da enzima carbapenemase e isoladas de amostras biológicas humanas da rotina do Hospital Universitário do Oeste do Paraná, localizado em Cascavel - PR. As amostras estão armazenadas no Laboratório de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE). As cepas foram recuperadas em *Tryptic Soy Broth* (TSB) e então transferidas (500 μ L) para eppendorfs com glicerina (300 μ L) e armazenadas a -20°C . Previamente aos testes, as cepas foram cultivadas em Ágar Nutriente.

Confirmação da presença de carbapenemase

Foi realizada a caracterização fenotípica das cepas por Teste de Hodge, conforme a *Clinical and Laboratory Standards Institute* [32]. As amostras foram cultivadas em Ágar Sangue no dia anterior ao teste. Uma suspensão da cepa padrão *Escherichia coli* ATCC compatível à concentração 10^8 foi preparada, diluída 1:10 e então inoculada em ágar Mueller Hinton formando um tapete uniforme. Os discos de ertapenem, meropenem e imipenem foram aplicados a uma distância de 20mm borda a borda e então foi feita inoculação das cepas com uma alça de 10 μ L em forma de linha partindo-se do disco em direção a borda da placa. Este

procedimento foi realizado com as cepas testes, um controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705) e um controle negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922). Foi considerado como resultado positivo qualquer deformação no halo de inibição.

Wickerhamomyces anomalus

A levedura utilizada foi molecularmente identificada como *Wickerhamomyces anomalus* WA92 e sua respectiva sequência está depositada no GenBank (número de acesso: KT580796 - Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), sendo anteriormente coletada às margens do Lago de Itaipu, localizado no estado do Paraná, Brasil e passou por testes de triagem para verificação de produção de micocina. Atualmente faz parte da micoteca do laboratório de micologia do LACEPE, armazenada de três formas: em geladeira, em temperatura ambiente e congeladas. Previamente à produção das micocinas, a cepa de WA92 foi reativada por inoculação em meio Ágar Sabouraud modificado (ágar 2%, peptona 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio dibásico 3,48%) pH 4,7 ± 2 e incubada a 37°C/ 48 horas.

Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura produtora de micocinas *W. anomalus* WA92 foi inoculada em frascos de roux com 200 mL de caldo Sabouraud modificado (1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico, pH 4,7) e incubado 25 °C por 5 dias. Após este período, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 min, obtendo o sobrenadante que foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4 °C.

Determinação da atividade de β-glucanases

A determinação de β-glucanases presentes no filtrado de WA92 foi realizada de acordo com Miller [33] com algumas adaptações, usando laminarina 1% (obtida de *Laminaria digitata*) em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 e curva padrão de glicose. A reação foi preparada utilizando 62,5 µL da amostra de sobrenadante WA92 e 125 µL de laminarina. Incubou-se a solução a 37°C por 10 minutos. Após este período, 100 µL da solução foram adicionados a 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para parar a reação. Para o branco foi usada a mesma solução do teste, sem a laminarina. Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos com consequente adição de 500 µL de água. A leitura do produto da reação, o açúcar reduzido, foi lido a 550 nm em espectrofotômetro. O teste foi realizado em triplicata.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose por minuto de reação, sendo definida como

U/min/mL, conforme as condições descritas.

A quantificação de proteínas foi realizada a partir do método baseado na absorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 proposto por Bradford [34]. Para a preparação da reação, misturou-se 1 mL do Reagente Bradford com 100 µL do extrato enzimático. Deixou-se a mistura em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, leu-se em espectrofotômetro a 595 nm. Além disso, foi realizada curva padrão a cada determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de soro albumina bovino (BSA), sendo a equação da reta utilizada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/mL.

A atividade específica de β -glucanases foi calculada dividindo a concentração de atividade enzimática pela concentração de proteínas.

Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Para os testes de microdiluição foi utilizado o método M7-A6 - *National Committee for Clinical Laboratory Standards* [35] com algumas adaptações. Utilizou-se microplacas contendo 96 poços e foram testadas as trinta cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, incluindo a cepa ATCC BAA 1705. As bactérias foram previamente ajustadas à concentração 10^3 UFC/mL, homogeneizadas em 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH) e distribuídas (100 µL) nas colunas, onde cada coluna corresponde a uma cepa teste de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase e cada linha uma concentração de sobrenadante das micocinas diluído em água estéril, que foram determinadas a partir da atividade de β -glucanases, sendo elas: 0,02; 0,03; 0,06; 0,12; 0,24 U/mg. Foram realizados controle de esterilidade (contendo caldo Sabouraud modificado estéril e caldo MH) e controle de crescimento (contendo caldo Sabouraud modificado estéril e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Após o término do procedimento, as placas foram lacradas e incubadas a 36 °C por 24 horas. O teste foi realizado em triplicata e a leitura foi visual, observando a turvação, sendo que a última diluição onde houve inibição do crescimento bacteriano foi tomada como resultado. Para confirmação da inibição, alíquotas de 10 µL foram retiradas dos poços-resultado e semeadas em ágar nutriente.

Atividade antimicrobiana em meio sólido

Foram preparados dois meios de ágar Mueller Hinton (MH), um controle e outro teste. O controle foi constituído de ágar MH e caldo Sabouraud modificado (1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico, pH 4,7) estéril e sem micocinas na proporção de 1:3. O teste foi constituído de ágar MH e sobrenadante contendo micocinas de WA92. Ambos os meios foram vertidos em placas Petri divididas. Com alça calibrada de 10 µL, foi semeada a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 no

controle e no teste, e incubado a 37 °C por 24 h. O teste foi realizado em triplicata.

Verificação de zona de inibição

Em placa de Petri, fez-se pré-forragem com Ágar-ágar e após solidificar, foi adicionado ágar nutriente. A cepa ATCC BAA 1705 de *Klebsiella pneumoniae* foi semeada em salina 0.9% com turvação compatível a escala 10⁸ de Mac Farland e com o auxílio de um swab foi semeada em placa pelo método de superfície. Orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram feitos sobre o ágar nutriente e então foram adicionados 10 µL de sobrenadante. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo (caldo Sabouraud modificado sem micocinas) e controle positivo (Polimixina B na concentração de 2,5 mg). As placas foram incubadas a 36°C por 48 h e qualquer zona clara em torno dos orifícios foi tomado como resultado positivo.

Teste de hemólise

A citotoxicidade em eritrócitos foi realizado conforme Paris *et al.* [31] Primeiramente, foi coletado sangue de um indivíduo saudável em tubo contendo EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid). O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min e a massa celular foi lavada três vezes com PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7,4. Uma suspensão de eritrócitos 4% foi feita em PBS, a qual foi testada sob diferentes concentrações do sobrenadante com β-glucanases (0,07; 0,15; 0,30; 0,59, 1,18 e 2,36 U/mg) e incubado a 37 °C por 1 h. O volume final do teste foi de 1 mL. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para determinar a absorção em espectrofotômetro a 450 nm. Além disso, foram realizados controle de eritrócitos íntegros (eritrócitos 4% e PBS) e controle de hemólise (eritrócito 4% e ácido acético 4%). O mesmo procedimento foi feito para Polimixina B, a qual foi utilizada 25.000 UI (posologia diária indicada por kg para cada paciente), sendo que a concentração testada representa 2,5 mg.

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

% Eritrócitos íntegros

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

Sendo:

A: Absorbância

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

Teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach

O teste foi realizado conforme Meyer *et al.* [36] com algumas adaptações. Ovos de *Artemia salina* foram incubados em água do mar estéril 28 ± 2 °C por 48 h sob contínua aeração e iluminação. Após eclosão, 10 náuplios (larvas) foram transferidos para tubos contendo 1000, 100 e 10 ppm de sobrenadante de WA92 em quantidade suficiente para 5 mL de água do mar. O controle de toxicidade máxima consistiu NaOH 1 mol L^{-1} e o controle atóxico continha somente água do mar. Os tubos foram incubados a 28 ± 2 °C por 24 h e o teste foi realizado em triplicata. A contagem foi realizada com o auxílio de microscópio óptico e foi levado em consideração a motilidade das larvas, sendo classificadas como vivas e mortas. O mesmo procedimento foi realizado com polimixina B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias produtoras de enzimas carbapenemases (KPC) se tornaram um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, pois apresentam uma resistência aos antibióticos carbapenêmicos, o que dificulta o tratamento e aumenta a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos, já que existem poucas alternativas eficazes para o tratamento das mesmas [37]. Acometem geralmente pacientes internados em áreas de alto risco, tais como unidades de terapia intensiva, porém áreas de menor risco, como cirúrgicas/clínicas e asilos também podem ser afetadas [38].

As cepas de KPC utilizadas neste trabalho representavam em sua maioria cepas de *Klebsiella pneumoniae*, sendo apenas duas cepas de *Enterobacter cloacae* e uma cepa de *Serratia marcescens*. Na literatura, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são as bactérias mais relatadas envolvidas na produção de enzima carbapenemase [39]. Outras espécies como *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* e *Morganella morganii* também são reportadas, porém com menos frequência [6, 40, 41].

Confirmação da presença de carbapenemase

Foi realizado teste de Hodge para confirmação da produção de carbapenemase, onde todas as cepas se mostraram positivas, conforme a **Figura 1**. O teste foi realizado de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* [32].

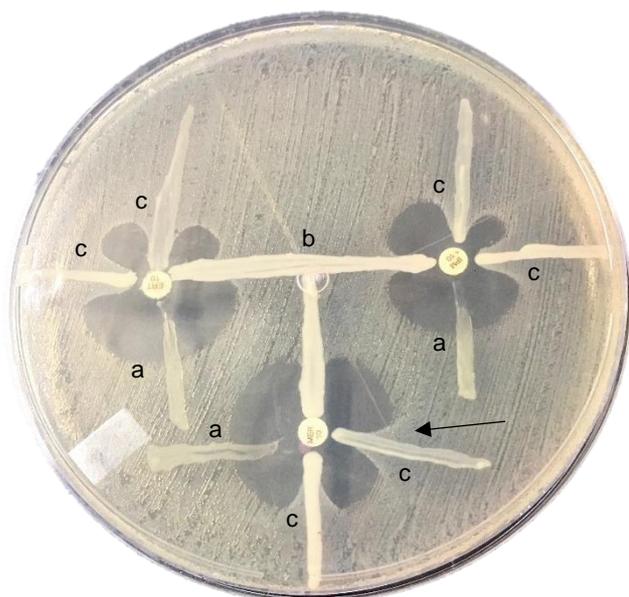


Figura 1: Confirmação da presença de carbapenemase por Teste de Hodge: a- Controle negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922); b- Controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705); c- Cepas teste (O teste de Hodge se mostra positivo quando há distorção no halo de inibição da cepa, conforme seta indicada na figura, o que confirma que a cepa é produtora de carbapenemase)

Testes fenotípicos, como o realizado neste trabalho, são utilizados pela maioria dos hospitais e laboratórios em todo o mundo por serem métodos de baixo custo e de simples realização [40]. Além disso, em regiões onde prevalecem isolados de *Klebsiella pneumoniae*, como é o caso deste trabalho, a determinação pelo teste Hodge tem sido proposta como método suficientemente sensível [42].

Atividade antimicrobiana em meio sólido e verificação de zona de inibição

Neste estudo, todas as cepas passaram por teste prévio para verificação da viabilidade deste trabalho. Isto foi feito testando o crescimento da bactéria no pH 4,7 o qual representa o pH do sobrenadante (dados não mostrados). Além disso, foi realizado um teste de atividade antimicrobiana em meio sólido (**Figura 2**), no qual é possível verificar a inibição da KPC quando em contato com micocinas de WA92 no lado A da imagem, sendo o controle (lado B) constituído de ágar Mueller Hinton e o caldo estéril sem micocinas, sendo assim, podemos descartar possíveis interferências dos componentes do caldo de produção das micocinas.

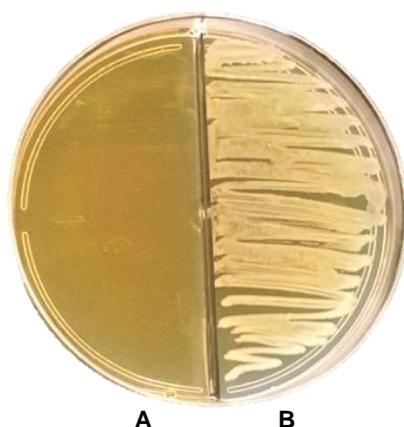


Figura 2: Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. Lado A (teste) constituído de sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 dissolvido em ágar Mueller Hinton e cepa de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase inoculado pelo método de superfície. Lado B (controle) constituído de caldo sem micocinas e cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 foi inoculada pelo método de superfície.

O fenômeno *killer* contra bactérias foi descoberto em 1986 por Polonelli e Morace e até então acreditava-se que a ação das micocinas se restringia apenas sob leveduras [43]. Olstorpe *et al.* [44] também relataram inibição de *Enterobacteriaceae* em grãos de cereais. Em 2013, foi demonstrado que as leveduras *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans*, *Candida tropicalis* e *W. anomalus*, induzem ruptura de células bacterianas, e consequentemente, lise bacteriana [45].

Neste estudo, a zona de inibição formada evidencia a difusão de micocinas de WA92 sobre o meio e mais uma vez mostra a inibição da bactéria KPC, conforme a **Figura 3**. Neste teste, mostramos também que o caldo sem micocinas não é capaz de inibir a bactéria (B) e como controle positivo, vemos um halo formado pela polimixina B na concentração de 2,5 mg (C).

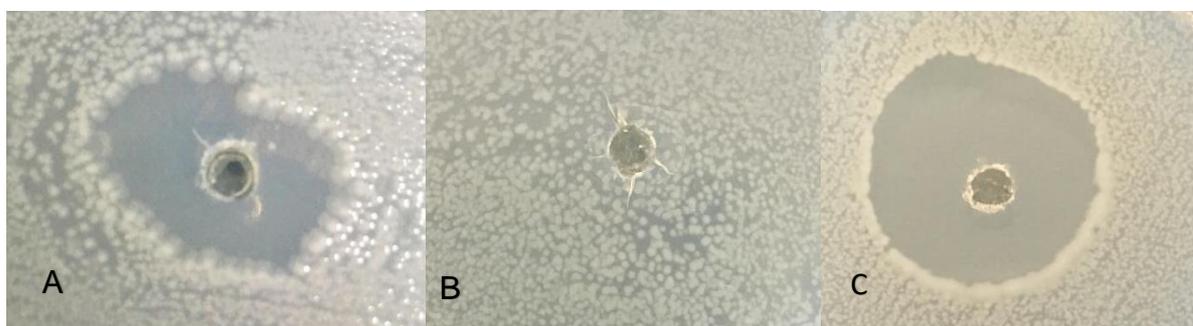


Figura 3: A: Zona de inibição: atividade killer de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 em meio sólido sobre cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705. B: Controle negativo: caldo Sabouraud modificado sem micocinas. C: controle positivo: Polimixina B na concentração de 2,5 mg.

GUO *et al.* [46], mostraram inibição de *Metschnikowia* por micocinas de *W. anomalus*, após testar as mesmas em orifício em meio sólido, obtendo zona de inibição. Tay *et al.* [17] também mostraram os efeitos inibitórios de *W. anomalus* contra *Candida mesorugosa* em

ensaio de difusão em poços. Wang *et al.* [47] obtiveram zonas de inibição sobre vários micro-organismos, entre eles *Metschnikowia bicuspidata*, *Saccharomyces sp.*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus aureus*, *Yarrowia lipolytica* e *Lodderomyces elongisporus*.

Determinação de proteínas e atividade de β -glucanases

As micocinas agem em células sensíveis por diversos mecanismos: inibição da replicação do DNA [16]; alterações de permeabilidade da membrana [48] e o ciclo celular na fase G1. Porém, como já relatado, acredita-se que o principal mecanismo de ação das micocinas esteja atribuído à hidrólise de glucano, gerando danos na parede celular, vazamento dos componentes citoplasmáticos e conseqüentemente morte celular [19, 22, 26, 27]. Tay *et al.* [17] isolaram e identificaram micocinas de *W. anomalus* como β -1,3 glucanase por espectrometria de massas e sua atividade foi confirmada.

As β -glucanases são enzimas multifuncionais que hidrolisam e degradam as glucanas [49,50], incluindo o β -1,3;1,6-glucano, constituintes da parede celular de alguns patógenos e liberando glucose como produto [51, 52]. Atuam em substratos constituídos de sequências lineares de unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,3 contendo uma extremidade terminal não redutora, sendo permitido um grau moderado de substituições [53]. A diferença nos padrões das micocinas de *W. anomalus* pode ser atribuído à especificidade das glucanases que têm preferência seletiva por diferentes tipos de ligações glicosídicas e receptores de glucana de micro-organismos [17].

A laminarina, isolada da alga *Laminaria digitata* e utilizada neste estudo para a determinação da atividade de β -glucanases, possui apenas 10% de grau de ramificação e tem sido muito utilizada como substrato para a determinação da atividade de β -1,3 glucanases [51].

Marco & Felix [54] monitoraram a produção de β -glucanases extracelular durante o crescimento do isolado de *Trichoderma harzianum* e a enzima foi considerada uma β -1,3-glucanase, uma vez que hidrolisou a laminarina e obteve atividade de 0,3 U/mL em 72 horas de crescimento. Estudo realizado com micocinas de *Williopsis saturnus* mostraram que as mesmas foram capazes de matar, mas não hidrolizaram a laminarina, podendo relacionar o potencial de inibição a outro mecanismo [47]. Lima *et al.* [55] obteve atividade de 1,3-glucanase para *W. anomalus* e *Meyerozyma guilliermondii* de 0,071 e 0,047 U/mg, respectivamente.

Neste estudo foram obtidos atividade enzimática de 0,139 U/min/mL e concentração de proteínas de 0,059 U/mg, sendo a atividade específica de β -glucanases de 2,36 U/mg, resultado superior ao encontrado na literatura. Isto pode estar relacionado as condições de cultivo do caldo ou ainda à maior produção da cepa de levedura.

Para os testes de microdiluição e hemólise, foi considerado que a atividade de β -glucanases encontrada (2,36 U/mg) estava relacionada a cada mL de caldo com micocina. Desta forma, calculamos as concentrações de acordo com o volume utilizado em cada teste.

Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Os testes de microdiluição baseados na concentração de β -glucanases (micocinas) presentes no sobrenadante de WA92 apresentaram atividade inibitória sobre as trinta cepas de KPC. Nas concentrações de 0,24 e 0,12 U/mg 100% (30/30) das cepas foram sensíveis, na concentração de 0,06 U/mg 36,7% (11/30) das cepas foram inibidas e na concentração de 0,03 e 0,02 U/mg 3,3% (1/30) das cepas foram susceptíveis às micocinas (**Figura 4**).

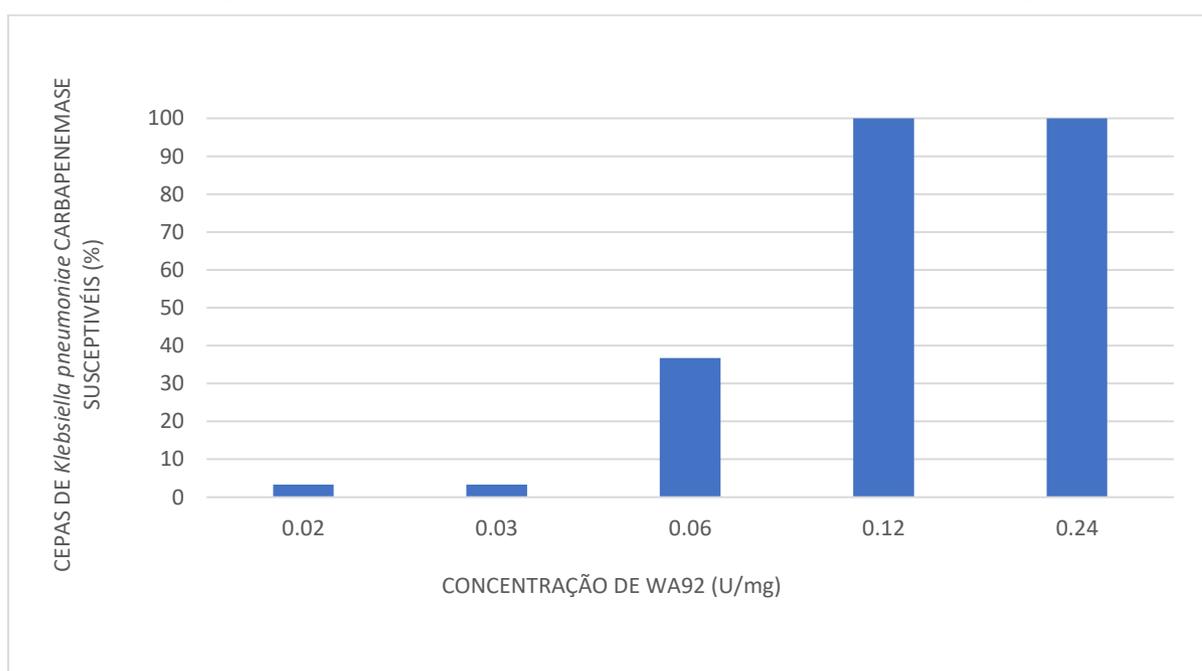


Figura 4: Susceptibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase frente às micocinas obtidas do sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* WA92.

Enterobacteriaceae já foram inibidas por micocinas de *W. anomalus*, porém o mecanismo ainda não foi descoberto [44, 56]. Capelli *et al.* [25] relatam que mesmo o mecanismo de inibição bacteriana sendo desconhecido, é provável que as micocinas desempenhem papel principal, como já demonstrado em diferentes bactérias e fungos. Outros micro-organismos já foram inibidos por micocinas produzidas de *W. anomalus*, entre eles: *Botrytis cinerea* [57]; *Penicillium* e *Aspergillus* [58, 59] e *Candida albicans* [31].

Teste de hemólise

Os resultados deste trabalho evidenciaram a baixa toxicidade das micocinas produzidas de *W. anomalus* no teste de hemólise realizado em eritrócitos humanos. Conforme

a **Figura 5**, as micocinas de WA92 apresentaram apenas 5,4% de hemólise na concentração de 1,18 U/mg de β -glucanases, sendo esta concentração superior às que mostraram inibição de 100% das cepas de KPC (**Figura 5**). A porcentagem de hemólise de polimixina B foi de 31%, sendo que essa foi realizada com 2,5 mg, que corresponde a 25000 UI. Visto que esta é a dosagem utilizada por kg de paciente, a porcentagem de hemólise mostrou valores consideravelmente mais altos que os encontrados para as micocinas.

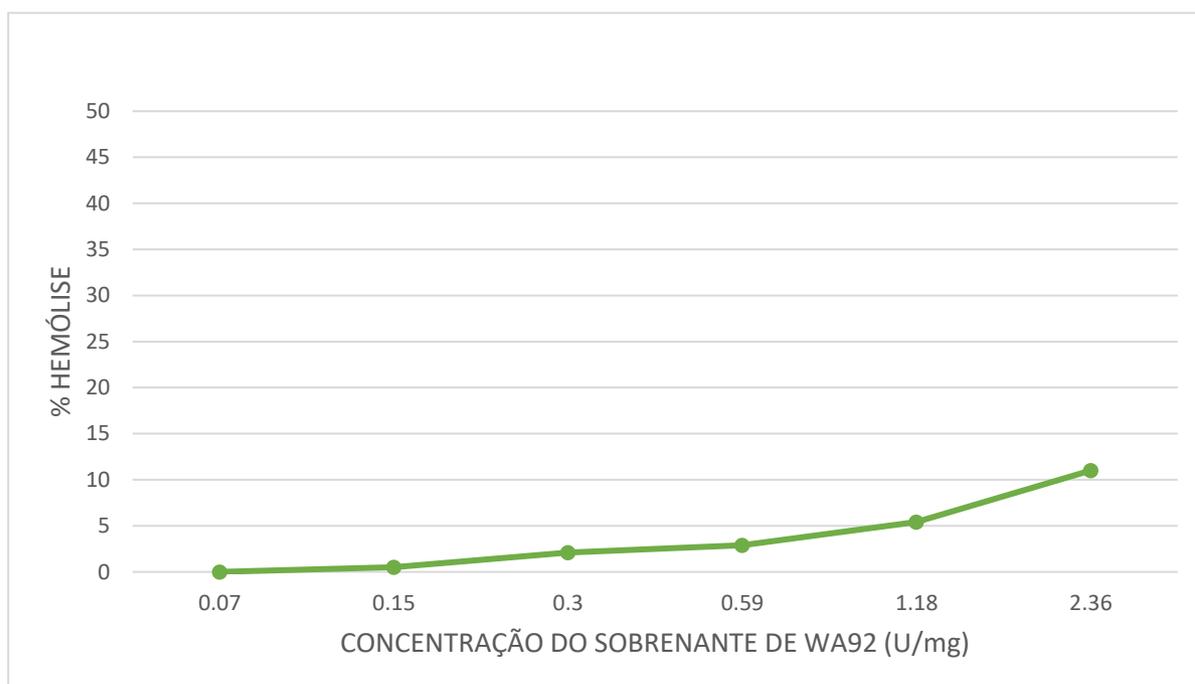


Figura 5: Ação hemolítica das micocinas obtidas de WA92 sobre eritrócitos humanos.

Outras micocinas já foram estudadas em testes de toxicidade e relatadas na literatura como não sendo hemolíticas. Entre elas, micocinas de *Candida albicans* com atividade inibitória das cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [30]. Leveduras de *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus* capazes de inibir micro-organismos patogênicos também foram testadas, porém em meio sólido e com sangue de cavalo, mostrando não serem hemolíticas [60]

Estudo realizado por Paris *et al.* [31] testou micocinas de *W. anomalus*, mostrando atividade inibitória sobre cepas de *Candida albicans* e obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho em relação a baixa citotoxicidade. Além disso, Rangel *et al.* [51] consideram baixa toxicidade substâncias que causam hemólise de até 40%.

Teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach

Artemia salina Leach é um microcrustáceo marinho utilizado em testes de toxicidade envolvendo extratos de plantas [62]. O teste em artemias foi realizado neste estudo por ser

de fácil manuseio, rápido, ter baixo custo e um grande potencial de substituir o uso de animais em ensaios toxicológicos [63].

As micocinas mostraram não causar toxicidade nos microcrustáceos testados até a concentração 1000 ppm, valores padronizados para o teste em plantas. Como comparação foi realizado o teste com polimixina B que mostrou toxicidade letal em todos os microcrustáceos na concentração de 1000 ppm. Desta forma, ressalta-se a baixa toxicidade das micocinas. Contudo, não foi encontrado na literatura estudos envolvendo micocinas neste tipo de teste.

Concluimos que as cepas de KPC se mostraram sensíveis às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 mesmo em concentrações baixas de β -glucanase. Os resultados deste estudo mostraram até o momento que as micocinas de *W. anomalus* WA92 são capazes de inibir cepas de KPC com baixa toxicidade e se mostram candidatas à aplicação em produtos antibióticos.

Declarações do autor

Autores e colaboradores

Todos os autores e colaboradores participaram de forma ativa na realização desta pesquisa, sendo suas funções:

Bruna Larissa Nascimento: Administração de Projetos (Responsável pela gestão e coordenação do planejamento e execução da atividade de pesquisa); Escrita - Preparação do rascunho original (Criação e / ou apresentação do trabalho publicado, especificamente escrevendo o rascunho inicial (incluindo tradução substantiva); Metodologia (Desenvolvimento ou desenho de metodologia; criação de modelos); Visualização (Preparação, criação e / ou apresentação do trabalho publicado, especificamente visualização / apresentação de dados).

Mateus Foltz Delabeneta: Metodologia (Desenvolvimento ou desenho de metodologia; criação de modelos).

Lana Rubia B. Rosseto: Validação (Verificação, seja como parte da atividade ou separada, da replicação / reprodutibilidade geral de resultados / experimentos e outros resultados de pesquisa).

Daniele S. B. Junges: Conceptualização (Idéias; formulação ou evolução de metas e objetivos de pesquisa abrangentes).

Ana Paula Paris: Investigação (Realização de um processo de pesquisa e investigação, realizando especificamente os experimentos ou coleta de dados / evidências).

Cristiane Persel: Conceptualização (Idéias; formulação ou evolução de metas e objetivos de pesquisa abrangentes).

Rinaldo Ferreira Gandra: Escrita - Revisão e Edição (Preparação, criação e / ou apresentação do trabalho publicado por aqueles do grupo de pesquisa original, especificamente revisão crítica, comentário ou revisão - incluindo as fases pré ou pós-publicação); Supervisão (Responsável pela supervisão e liderança do planejamento e execução da atividade de pesquisa, incluindo orientação externa à equipe principal).

Conflitos de interesse

"Os autores declaram que não há conflitos de interesse".

Informação de financiamento

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Agradecimentos:

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências:

- 1- Kitchel B, Rasheed JK, Pereira JB, Srinivasan A, Venezianavon S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents and Chemother* 2009 53 (8): 3365-3370. doi:10.1128/AAC.00126-0
- 2- Spanu T, Fiori B, D'inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* genes (blaKPC). *J Clin Microbiol* 2012 50 (8): 2783-2785. doi:10.1128/JCM.00284-12
- 3- Munoz-price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*. *Lancet infect dis* 2013 13 (9): 785-796. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7
- 4- Silva KE, Maciel WG, Sacchi FPC, Carvalhaes CG, Costa FR, Silva ACR, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery. *J Medl Microbiol* 2016 65: 547-553. doi:10.1099/jmm.0.000254
- 5- Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents and Chemother* 2015 59 (10): 5873-5884. doi:10.1128/AAC.01019-15

- 6- Amjad A, Mirza IA, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol* 2011 3 (4):189-193.
- 7- Almeida ACS, Vilela MA, Cavalcanti FLS, Martins WMBS, Morais MA, Morais MMC. First description of KPC-2-producing *pseudomonas putida* in brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56 (4): 2205-2206. doi:10.1128/AAC.05268-11
- 8- Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol* 2009 47 (1): 239-241. doi: 10.1128/JCM.02123-08
- 9- Del-peloso PF, Barros MFL, Santos FA. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. *J Bras Patol Med Lab* 2010 46 (5): 365-367.
- 10- Centonze AR, Bertocelli A, Savio C, Orza P, Bedenic B, Mazzariol A. Evaluation of rapid KPC carbapenemase detection method based on MALDI-TOF VITEK MS spectra analysis. *J Med Microbiol* 2018 67:1474-1479. doi:10.1099/jmm.0.000831
- 11- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis C. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014 20 (9):839-853.
- 12- Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wiczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, et al. The KPC type β -lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia Histochem Cytobiol* 2009 47 (4):537-543. doi: 10.2478/v10042-009-0079-y
- 13- Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vrtizili S, Chelvatzoglou FC, Papaioannou V, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case-control study. *J Antimicrob Chemother* 2007 60 (5):1124-1130. doi: 10.1093/jac/dkm356
- 14- Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-Sanfrancisco C, Gudiol C, et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015 33 (5): 337.e1-337.e21. doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.009
- 15- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, Georgia; US Department of Health and Human Services 2013.
- 16- Schmitt M J, Breinig F. The viral *killer* system in yeast: From molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev* 2002 26 (3): 257-276.
- 17- Tay S, Lim S, Tan H. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *Complemento BMC Altern Med* 2014 14: 439.
- 18- Bevan EA, Makower M. The physiological basis of the killer character in yeast. XIth Int. Congr. Genet., The Netherlands: Pergamon Press 1 1963 1: 202-203.
- 19- Schneider J, Rupp O, Trost E, Jaenicke S, Passoth V, Goesmann A, et al. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS Yeast Res.* 2012 12 (3): 382-386. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x
- 20- Sundh I, Melin P. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011 99 (1):113-119. doi:10.1007/s10482-010-9528-z
- 21- Walker GM. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011 99 (1): 25-34. doi:10.1007/s10482-010-9491-8
- 22- Muccilli S, Wemhoff S, Restuccia C, Meinhardt F. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast* 2013 30: 33-43. doi:10.1002/yea.2935

- 23- Polonelli L, Lorenzini R, Bernardis F, Morace G. Potential therapeutic effect of yeast *killer* toxin. *Mycopathologia* 1986 107:103-107.
- 24- 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* 2011 99 (1):35-41. doi:10.1007/s10482-010-9496-3
- 25- Cappelli A, Ulissi U, Valzano M, Damiani C, Epis S, Gabrielli MG, et al. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *Plos One* 2014 9 (5): 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0095988
- 26- Izgü F, Altinbay D, Türeli AE. In vitro activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. *Mycoses* 2007 50 (1):31-34. doi:10.1111/j.0933-7407.2006.01303.x
- 27- Izgu DA, Kepekci RA, Izgu F. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011 99 (1): 85-91. doi:10.1007/s10482-010-9527-0
- 28- Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 1983 17 (5): 774-780.
- 29- Bajaj BK, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol* 2012 53 (8): 645-656. doi:10.1002/jobm.201200187
- 30- Seddik HA, Ceugniesz A, Bendali F, Cudennec B, Drider D. Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans* *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 2016 198: 71-81. doi:10.1007/s00203-015-1152-x
- 31- Paris AP, Persel C, Serafin CF, Simão RCG, Gandra RF. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. *Curr Microbiol* 2016 73 (6): 878-884. doi:10.1007/s00284-016-1135-4
- 32- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20-U. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2010.
- 33- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959 31:426-428.
- 34- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 72:248.
- 35- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- 36- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J Med Plant Res* 1982 45: 31-34.
- 37- Correa L, Martino MDV, Siqueira I, Pasternak J, Gales AS, Silva CV et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infect Dis* 2013 11: 13-80. doi: 10.1186/1471-2334-13-80.
- 38- Velasco C, Rodriguez-Bano J, Garcia L, Diaz P, Lupion C, Duran L et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum β -lactamase. *J Hosp Infect* 2009 73:157-163.

- 39- Sheng WH, Badal RE, Hsueh PR. Distribution of Extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intraabdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Antimicrob Agents Chemother* 2013 57 (7): 2981-2988. doi:10.1007/s10096-011-1481-x
- 40- Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012 50 (4): 1298-1302.
- 41- Tavares CP, Pereira PS, Marques EA, Jr CF, Souza MPAH, Almeida R, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015 82 (4): 326–330.
- 42- Tsakris A, Kristo L, Poulou A, Themeli-digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2009 47 (2): 362–367. doi:10.1128/JCM.01922-0
- 43- Polonelli L, Morace G. Reevaluation of the yeast *killer* phenomenon. *J Clin Microbiol* 1986 24 (5): 103-107.
- 44- Olstorpe M, Borling J, Schnürer J, Passoth V. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Anim Feed Sci Technol* 2010 156: 47-56. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.12.008
- 45- Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics and Antimicro Proteins* 2013 5:8-17. doi:10.3389/fmicb.2012.00421
- 46- Guo FJ, Ma Y, Xu HM, Wang XH, Chi ZM. A novel *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013 103 (4):737–746. doi: 10.1007/s10482-012-9855-3
- 47- Wang XX, Chi Z, Peng Y, Wang XH, Ru SG, Chi ZM. Purification, characterization and gene cloning of the *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol Res* 2012 167:558-56.
- 48- Kagan BL. Mode of action of yeast *killer* toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature* 1983 302:709-711.
- 49- Pitson SM, Seviour RJ, Mcdougall BM. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb Technol* 1993 15 (3):178-190.
- 50- Kumar NN, Deobagkar DN. Multifunctional glucanases. *Biotechnol Adv* 1996 14 (1): 1-15.
- 51- Iorio E, Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, Ferretti A, Giannini M, et al. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -D-(1,6)-glucan with β -D-(1,3)-side chains. *Carbohydr Res* 2008 343 (6): 1050-1061.
- 52- Fleuri LF, Sato HH. β -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciênc. Agrotec* 2008 32 (4): 1224-1231.
- 53- Bauermeister A, Rezende MI, Giese EC, HUIBERT RF, BARBOSA AM. Fungal β -1,3-Glucanases: production and biotechnological applications. *Ciências Exatas e Tecnológicas* 2010 31 (2): 75-86.
- 54- Marco J, Felix C. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzarium* Showing Bioncontrol Potential. *Braz Arch Biol Technol* 2007 50 (1): 21-29.
- 55- Lima JR, Gondim DMF, Oliveira JTA, Oliveira FSA, Gonçalves LRB, Viana FMP. Use of *killer* yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol Technol* 2013 83: 58-64.

- 56- Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011 99 (1): 121-125. doi: 10.1007/s10482-010-9508-3
- 57- Friel D, Pessoa NMG, Vandenbol M, Jijakli MH. Separate and combined disruptions of two exo-beta-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Mol Plant-Microbe Interact* 20 (4): 371–379. doi: 10.1094/MPMI-20-4-037
- 58- Petersson S, Schnürer J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 1995 61 (3):1027–1032.
- 59- Fredlund E, Druvefors UA, Olstorpe MN, Passoth V, Schnürer J. Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. *FEMS Microbiol Lett* 2004 238 (1):133–137. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.027
- 60- Ceugniet A, Drider D, Jacques P, Coucheney F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tommed'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 2015 52: 177-184.
- 61- Rangel M, Malpezzi ELA, Susini SMM, Freitas JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* 1997 35 (2): 305-309.
- 62- Arcanjo DDR, Albuquerque ACM, Melo-Neto B, Santana LCLR, Medeiros MGF, Citó AMGL. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.* 2012 72: 505-509.
- 63- Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU J. Pharm. Sci* 2015 23: 20-24.

CAPÍTULO 2

Micocinas: um grande potencial para aplicação em saúde

Bruna Larissa Nascimento¹, Mateus F. Delabeneta¹, Lana Rubia B. Rosseto¹, Daniele S. B. Junges¹, Ana Paula Paris¹, Cristiane Persel¹ e Rinaldo F. Gandra¹.

¹ Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves, 3224, Cascavel, Paraná 85806-470, Brasil.

Autor correspondente:

Rinaldo Ferreira Gandra

ORCID:

+55 (45) **3321-5151**

E-mail: rinaldo.gandra@unioeste.br

Agradecimentos:

Nós agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Resumo:

Após descritas na literatura, as micocinas têm demonstrado atividades distintas e de grande amplitude contra diversos microrganismos. São definidas como proteínas ou glicoproteínas extracelulares com ação no rompimento da membrana celular por diversos mecanismos, sendo o principal mecanismo de ação a inibição da síntese de β -glucano na parede celular de cepas sensíveis. Estudos já relatados mostram potencial inibitório das micocinas sobre fungos, bactérias, parasitas e vírus, além de serem estudadas como marcadores epidemiológicos e no desenvolvimento de vacinas. Visto a problemática da resistência criada por vários microrganismos aos agentes comumente utilizados na prática clínica, a descoberta de novas substâncias com esta finalidade torna-se essencial. Apesar de necessitarem de novas pesquisas que possam esclarecer dúvidas e comprovar seus mecanismos, vários estudos já apontam que as micocinas atuam de uma forma específica e com possibilidades mínimas de toxicidade, além de não apresentarem nenhuma resistência, mostrando seu alto potencial para aplicação na saúde.

Palavras chave: micocinas, sistema *killer*, antimicrobianos, leveduras *killer*.

Descoberta das micocinas e suas aplicações gerais

Recentemente têm-se observado a capacidade de algumas leveduras em liberar compostos com propriedades antimicrobianas, conhecidos como micocinas, toxinas *killer* ou zimocinas. Estas são proteínas ou glicoproteínas extracelulares que atuam no rompimento da membrana celular e podem exercer seus efeitos em microrganismos distintos e do mesmo gênero ou espécie (Hatoum et al. 2012; Tay et al. 2014; Wemhoff et al. 2014).

As micocinas mais estudadas na literatura são classificadas como β -glucanases, que são enzimas multifuncionais que hidrolisam e degradam as glucanas (Pitson et al., 1993; Kumar & Deobagkar, 1996), incluindo o β -1,3;1,6-glucano, constituinte da parede celular de fungos liberando glucose como produto (Iorio et al., 2008). Tay et al. (2014) isolaram e identificaram

micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* como β -1,3 glucanase. Marco e Felix (2007) monitoraram a produção de β -glucanases extracelular durante o crescimento do isolado de *Trichoderma harzianum* e a enzima foi considerada uma β -1,3-glucanase.

O fenômeno *killer* de leveduras deriva da atividade letal de micocinas secretadas por cepas, as quais são imunes a sua própria toxina, expressando receptores específicos na parede celular (Cappelli et al., 2014).

Este comportamento foi observado primeiramente por Bevan e Makower (1963) em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Após descoberto, passou a ser estudado e identificado em outras leveduras, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Wickerhamomyces*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (Schmitt and Breinig, 2002; Tay et al., 2014).

A produção de micocinas pode ser considerada uma estratégia de sobrevivência no ambiente por competição de nutrientes, representando uma vantagem importante para a espécie produtora (Cappelli et al., 2014). Seu principal poder de ação é relacionado contra leveduras, que possuem receptores para esta toxina, porém, também possuem efeito contra outros microrganismos, como as bactérias (Cappelli et al., 2014; Muccilli and Restuccia, 2015) Os principais mecanismos de ação para inibição de através de micocinas são: inibição da síntese de β -glucano ou hidrólise de β -glucano na parede celular de cepas sensíveis (Muccilli et al., 2013); interrupção de divisão celular, bloqueando a síntese do DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Marquina et al., 2002; Klassen and Meinhardt, 2005); clivagem do RNAt (Klassen et al., 2008); bloqueio de absorção de cálcio (Brown et al., 2011) e vazamento de íons causado pela formação de canais no citoplasma (Schmitt and Breinig, 2006; Santos et al., 2007). Já o mecanismo de inibição bacteriano ainda é desconhecido (Olstorpe et al., 2010; Passoth et al., 2011).

As leveduras produtoras de micocinas já são utilizadas na indústria alimentícia em várias aplicações, como: biopreservação e fermentação (Schneider et al., 2012); otimização de bebidas, como cerveja e vinho (Laitila et al., 2011; Swangkeaw et al., 2011; Satora et al., 2014;

Schwentke et al., 2014); agentes de biocontrole (Hua et al., 2015) e fungicidas pós-colheita, isto porque a maioria das leveduras não são consideradas patogênicas e se adaptam facilmente às condições ambientais (Olstorpe and Passoth, 2011). Outras aplicações já estudadas incluem a biorremediação ambiental, biofármacos e biocombustíveis, consolidando seu potencial para aplicação em saúde (Polonelli et al., 2011; Walker, 2011; Fernández et al., 2012; Sun et al., 2012; Mehlomakulu et al., 2014).

Inibição de microrganismos e aplicação em saúde

Devido à grande problemática da resistência criada pelos microrganismos aos agentes utilizados na prática clínica, a busca por antimicrobianos alternativos tornou-se urgentemente necessária. Em meio às novas moléculas pesquisadas, as micocinas são consideradas fontes naturais de propriedades antimicrobianas contra agentes patogênicos, como parasitas protozoários transmitidos por artrópodes, entre eles *Leishmania* spp. (Savoia et al., 2002; Bajaj et al., 2012; Cappelli et al., 2014; Muccilli and Restuccia, 2015).

Acreditava-se que a ação das micocinas se restringia apenas sob leveduras (Bilinski et al., 1985) contudo estudos também relatam a inibição bacteriana. Polonelli e Morace (1986) relataram pela primeira vez o fenômeno *killer* contra bactérias. Em um estudo mais recente, foi demonstrado que as leveduras *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans*, *Candida tropicalis* e *Wickerhamomyces anomalus*, induziram vazamento em células bacterianas, e consequentemente, lise bacteriana (Hatoum et al., 2013). Outro estudo, realizado com *Pichia pastoris*, demonstrou a inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium in vitro* e a redução da adesão bacteriana às células HCT-116 de câncer colorretal humano (França et al., 2015).

Chen et al. (2015) isolaram cepas de *Kluyveromyces marxianus* produtoras de micocinas e demonstraram que os extratos brutos foram eficazes na prevenção da doença de *Escherichia coli* em camundongos. Leveduras de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*,

isoladas de queijo, foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como por exemplo, *Candida albicans* e *Listeria monocytogenes* (Ceugniez et al. 2015).

A micocina RY55 produzida por *Pichia kudriavzevii* já mostrou exercer atividade inibitória sobre várias bactérias patogênicas de importância clínica e saúde humana, tais como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (Bajaj et al. 2012). Estudo realizado em 2016 mostrou a atividade inibitória de *Candida albicans* isolada de crianças sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Seddik et al., 2016).

As micocinas produzida pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* também já mostrou inibição de vários microrganismos, sendo eles: *Botrytis cinerea* (Friel et al., 2007); *Penicillium*, *Aspergillus* (Petersson and Schnurer 1995; Fredlund et al. 2004); *Candida albicans* (Paris et al., 2016); e *Enterobacteriaceae* (Olstorpe et al., 2010; Passoth et al., 2011). Mesmo sendo o mecanismo de inibição bacteriana desconhecido, é provável que a micocina desempenhe papel principal, como já demonstrado em diferentes microrganismos (Cappelli et al., 2014).

Além disso, a inibição por micocinas obtidas de *Wickerhamomyces anomalus* foi demonstrada em *Candida albicans* tanto *in vitro* como *in vivo*, em função das toxinas liberadas que hidrolisam os β -1,3-glucanos, componentes essenciais da parede celular de células fúngicas (Sawant et al., 1988; Polonelli et al., 1990; Buzzini and Martini 2001). A atividade de *Zygosaccharomyces bailii* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Sporothrix schenckii* também já foi relatada (Weiler and Schmitt 2003). Paris et al. (2016) recentemente também verificaram ação inibitória frente a diversas cepas patogênicas de *Candida albicans* e baixa atividade citotóxica quando em contato com eritrócitos obtidos de um indivíduo saudável. Desta maneira, as micocinas também se apresentam como uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação em dermatofitoses crônicas e severas.

Atualmente existe um grande aumento de agentes tópicos no tratamento de dermatofitoses, principalmente pelos efeitos adversos notavelmente menores. As micocinas já

mostraram atividade inibitória via tópica sobre lesões em animais, provocadas por *Malassezia furfur* e *Malassezia pachydermatis*, fundamentando seu potencial inibitório de micocinas, via tópica, no tratamento de microrganismos sensíveis (Polonelli et al., 1990). Nestes casos, as micocinas podem otimizar o tratamento e reduzir os efeitos indesejáveis por serem seletivas (Izgü et al., 2007).

A **Tabela 1** descreve resumidamente os principais estudos já relatados envolvendo micocinas com atividade antimicrobiana e aplicações na saúde, conforme foi mostrado no decorrer do texto.

Leveduras killer envolvidas na inibição	Microrganismos inibidos e/ou atividade relatada	Pesquisadores
<i>Malassezia furfur</i> e <i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Citrobacter freundii</i> e <i>Pseudallescheria boydii</i>	Polonelli e Morace (1986)
<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Vazamento e lise celular em células de <i>Listeria monocytogenes</i>	Hatoum et al., 2013
<i>Pichia pastoris</i>	Inibição do crescimento de <i>Salmonella typhimurium in vitro</i> e a redução da adesão bacteriana às células HCT-116 de câncer colorretal humano	França et al., 2015
<i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e atuou na prevenção da doença de <i>Escherichia coli</i> em camundongos.	Ceugniez et al., 2015; Chen et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i> (micocina RY55)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Bajaj et al., 2012

<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Seddik et al., 2016
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>	Friel et al., 2007; Petersson and Schnurer 1995; Fredlund et al., 2004; Paris et al., 2016; Olstorpe et al., 2010; Passoth et al., 2011
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> <i>glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Sporothrix schenckii</i>	Weiler and Schmitt, 2003

Tabela 1: Leveduras Killer com atividade antimicrobiana

Outros estudos indicam que leveduras produtoras de micocina habitam o intestino de *Anopheles stephensi*, vetor da malária, mostrando a possibilidade de usar esta levedura como ferramenta para controle simbiótico da doença. Leveduras *killer* também foram encontradas em outras espécies de vetores, como *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, mostrando que, apesar de necessitar de outras investigações, as micocinas podem ser um meio alternativo para lutar contra doenças infecciosas, reduzindo ou eliminando o vetor (Ricci et al., 2011; Cappelli et al., 2014; Valzano et al., 2016).

Polonelli *et al.* (2014) mostrou a possibilidade de desenvolver vacinas utilizando o mesmo mecanismo de ação das micocinas, com ação sobre a parede de β - 1,3-glucano. Para isso, foi utilizado um anticorpo monoclonal em camundongos imitando a atividade *killer* produzida por *Wickerhamomyces anomalus*. Magliani *et al.* (2004) já haviam relatado que novos estudos poderiam produzir vacinas inovadoras como estratégias para prevenir e tratar infecções imitando um processo natural, ajudando assim com o crescente problema do surgimento de resistência antimicrobiana e a propagação de algumas infecções.

Segundo Hatoum *et al.* (2013) as leveduras com capacidade de produzir micocinas também inibem o crescimento de microrganismos patogênicos no sistema gastrointestinal.

As micocinas também podem ser utilizadas como marcador epidemiológico de leveduras através do método conhecido como sistema *Killer*, preconizado em 1983. O método baseia-se na sensibilidade de cepas de *Candida albicans* frente às micocinas produzidas por 9 espécies pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*. Já em 1995, um estudo mostrou que esse método pode estabelecer a origem, controlar e acompanhar algumas infecções fúngicas. Através disso, a origem e disseminação em populações diversas poderiam ser verificadas, assegurando o conhecimento preciso das leveduras presentes nas infecções fúngicas (Polonelli et al., 1983; Candido et al., 1995).

Estudo realizado com uma cepa da levedura de *Wickerhamomyces anomalus*, isoladas do vetor da malária, mostrou ser ativo em uma grande faixa de pH, que varia de 4,5 até 8,0 mostrando que o pH não é um fator limitante (Cappelli et al., 2014). Sendo assim, a levedura é tolerante as condições extremas de estresse ambiental, conseguindo adaptar-se a uma ampla gama de condições, como: pH baixo e alto, baixa atividade da água, alta pressão osmótica, baixas concentrações de oxigênio e variáveis temperaturas (Olstorpe and Passoth, 2011; Walker, 2011; Satora et al., 2014).

Ressalta-se que as micocinas não se mostram hemolíticas em testes realizados, além de indicarem baixa probabilidade de indução a resistência (Polonelli et al., 1983; Izgü et al., 2007; Izgu et al., 2011; Muccili et al., 2012; Paris et al., 2016; Seddik et al., 2016). Sendo assim, as micocinas podem ser um grande potencial no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Bajaj et al., 2012).

Conclusão

Várias pesquisas vêm mostrando a capacidade das micocinas, que surpreendem pesquisadores ao inibirem os mais diversos tipos de microrganismos e se mostrarem minimamente tóxicas. Além deste potencial, são estudadas no desenvolvimento de vacinas e utilizadas como marcadores epidemiológicos. Novos estudos podem esclarecer seu modo de ação, reduzir suas limitações e confirmar que estas não são nocivas. Ademais, podem aumentar

a gama de microrganismos inibidos por estas toxinas, tornando-as ainda mais interessantes para aplicação em saúde.

Referências

Bajaj BK, Raina S, Singh S (2013) Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol* 1–11. doi: 10.1002/jobm.201200187

Bevan EA, Makower M (1963) The physiological basis of the killer character in yeast. *XIth Int. Congr. Genet.* The Netherlands: Pergamon Press 1: 202–203.

Bilinski CA, Innamorato G, Stewart GG (1985) Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast Genera. *Appl Environ Microbiol* 50: 1330–1332.

Brown DW (2010) The KP4 killer protein gene family. *Curr Genet* 57: 51–62.

Buzzini P, Martini A (2001) Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J Clin Microbiol* 39: 3362–3364. doi: 10.1128/JCM.39.9.3362

Candido RC, Fischman O, Zaror L, Ito IY (1995) Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. *Rev Soc Bras Med Trop*, 50: 21-324.

Cappelli A, Ulissi U, Valzano M, et al (2014) A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *Plos One*, 9 9:e95988. doi: 10.1371/journal.pone.0095988

Ceugniesz A, Drider D, Jacques P, Coucheney F (2015) Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 52: 177-184. doi: 10.1016/j.fm.2015.08.001

Chen Y, Aorigele C, Wang C, Simujide H, Yang S (2015) Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from koumiss and their antibacterial effect. *Journal of Food and Nutrition Research* 3: 52-56.

Fernández PM, Martorell MM, Fariña JI, Figueroa LIC (2012) Removal Efficiency of Cr⁶⁺ by Indigenous *Pichia* sp. Isolated from Textile Factory Effluent. *Sci World J* 2012:1–6. doi: 10.1100/2012/708213

França RC, Conceição FR, Mendonça M, et al (2015) *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol* doi: 10.1007/s00253-015-6696-9

Fredlund E, Druvefors UÄ, Olstorpe MN, et al (2004) Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. *FEMS Microbiol Lett* 238:133–137. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.027

Friel D, Pessoa NMG, Vandenbol M, Jijakli MH (2007) Separate and combined disruptions of two exo-beta-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Mol Plant Microbe Interact* 20:371–379. doi: 10.1094/MPMI-20-4-0371

Hatoum R, Labrie S, Fliss I (2012) Antimicrobial and probiotic properties of yeasts : from fundamental to novel applications. *Front Microbiol* 3:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421

Hatoum R, Labrie S, Fliss I (2013) Identification and Partial Characterization of Antilisterial Compounds Produced by Dairy Yeasts. *Probiotics Antimicrob Proteins* 8–17. doi: 10.1007/s12602-012-9109-8

Hua SST, Hernlem BJ, Yokoyama W, Sarreal SBL (2015) Intracellular trehalose and sorbitol synergistically promoting cell viability of a biocontrol yeast, *Pichia anomala*, for aflatoxin reduction. *World J Microbiol Biotechnol* 31:729–734. doi: 10.1007/s11274-015-1824-3

Iorio E, Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, Ferretti A, Giannini M, et al (2008) *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -D-(1,6)-glucan with β -D-(1,3)-side chains. *Carbohydr Res* 343 (6): 1050-1061.

Izgu DA, Kepekci RA, Izgu F (2011) Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:85–91. doi: 10.1007/s10482-010-9527-0

Izgü F, Altınbay D, Türeli AE (2007) In vitro activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. *Mycoses* 50:31–34. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01303.

Klassen R, Meinhardt F (2005) Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol* 7:393–401. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00469.

Klassen R, Paluszynski JP, Wemhoff S, et al (2008) The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA Gln. *Molecular Biology*, 69:681–697. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06319.

Kumar NN, Deobagkar DN (2011) Multifunctional glucanases. *Biotechnol Adv* 1996 14 (1): 1-15.

Laitila A, Sarlin T, Raulio M, et al (2011) Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). *Antonie van Leeuwenhoek* 99:75–84. doi: 10.1007/s10482-010-9511-8

Magliani W, Conti S, Salati A, Vaccari S, Ravanetti L, Maffei DL, Polonelli L (2004) Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Res*, 5: 11–18.

Marco J, Felix C (2007) Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzarium* Showing Bioncontrol Potential. *Braz Arch Biol Technol* 50 (1): 21-29.

Marquina D, Santos A, Peinado J (2002) Biology of killer yeasts. *Int Microbiol* 5: 65–71. doi: 10.1007/s10123-002-0066-z

Mehlomakulu NN, Setati ME, Divol B (2014) Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non- *Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp . *Int J Food Microbiol* 188:83–91. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015

Muccili S, Wemhoff S, Restuccia C, Meinhardt F (2012) Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast* 30:33-43. doi: 10.1002/yea.2935

Muccilli S, Restuccia C (2015) Bioprotective Role of Yeasts. 588–611. *Microorganisms* 4:588-611. doi: 10.3390/microorganisms3040588.

Olstorpe M, Borling J, Schnürer J, Passoth V (2010) *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Anim Feed Sci Technol* 156:47–56. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.12.008

Olstorpe M, Passoth V (2011) *Pichia anomala* in grain biopreservation. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:57–62. doi: 10.1007/s10482-010-9497-2

Paris A, Persel C, Serafin CF, et al (2016) Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. *Curr Microbiol* 73:878-884. doi: 10.1007/s00284-016-1135-4

Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J (2011) Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:121–125. doi: 10.1007/s10482-010-9508-3

Petersson S, Schnurer J (1995) Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 61:1027–1032.

Pitson SM, Seviour RJ, Mcdougall BM. (1993) Noncellulolytic fungal β glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb Technol* 15 (3):178-190.

Polonelli L, Conti S, Gerloni M, et al (1990) Production of yeast killer toxin in experimentally infected animals. *Mycopathologia* 110:169–175

Polonelli L, Magliani W, Ciociola T, et al (2011) From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:35–41. doi: 10.1007/s10482-010-9496-3

Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. (1983) Killer System : a Simple Method for Differentiating *Candida albicans* Strains. *J Clin Microbiol* 17:774–780

Polonelli L, Beninati C, Teti G, et al (2014) Yeast Killer Toxin-Like Candidacidal Ab6 Antibodies Elicited through the Manipulation of the Idiotypic Cascade. *Plos One* 9:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0105727

Polonelli L, Morace G (1986) Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. *J Clin Microbiol* 24:866–869

Ricci I, Mosca M, Valzano M, Damiani C et al. (2011) Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:43–50. doi: 10.1007/s10482-010-9532-3

Santos A, Mauro MS, Abrusci C, Marquina D (2007) Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Molecular Biology* 64:831–843. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05702.

Satora P, Tarko T, Sroka P, Blaszczyk U (2014) The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Res* 14:729–740. doi: 10.1111/1567-1364.12159

Savoia D, Avanzini C, Conti S, Magliani V, Frazzi R, Polonelli L. (2002) In Vitro Leishmanicidal Activity of a Monoclonal Antibody mimicking a Yeast Killer Toxin. *J Eukaryot Microbiol* 49:319–323.

Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG (1988) Anti-Candida albicans Activity of *Pichia anomala* as Determined by a Growth Rate Reduction Assay. *Appl Environ Microbiol* 54:1099–1103

Schmitt MJ, Breinig F (2002) The viral killer system in yeast: From molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26:257–276. doi: 10.1016/S0168-6445(02)00099-2

Schmitt MJ, Breinig F (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:212–221. doi: 10.1038/nrmicro1347

Schneider J, Rupp O, Trost E, et al (2012) Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS Yeast Res* 12:382–386. doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00791.

Schwentke J, Sabel A, Petri A, König H, Claus H (2014) The yeast *Wickerhamomyces anomalus* AS1 secretes a multifunctional exo-beta-1,3-glucanase with implications for winemaking. *Yeast* 31: 349-59.

Seddik, H.A., Ceugniz, A., Bendali, F., Cudennec, B. e Drider, D. (2016) Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans* *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 198:71–81. doi: 10.1007/s00203-015-1152-x

Sun HY, Wang K, Chi Z, Xu HM, CHI, ZM (2012) Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. *Process Biochem* 47:251–256. doi: 10.1016/j.procbio.2011.10.040

Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke CE, Vichitphan K (2011) Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora sp.* and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World J Microbiol Biotechnol* 27:423–430. doi: 10.1007/s11274-010-0474-8

Tay S-T, Lim S-L, Tan H-W (2014) Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complement Altern Med* 14:439. doi: 10.1186/1472-6882-14-439

Valzano M, Cecarini V, Cappelli A, et al (2016) A yeast strain associated to *Anopheles mosquitoes* produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malar J* 1–9. doi: 10.1186/s12936-015-1059-7

Walker GM (2011) *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99:25–34. doi: 10.1007/s10482-010-9491-8

Weiler F, Schmitt MJ (2003) Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res* 3:69–76.

Wemhoff S, Klassen R, Meinhardt F (2014) Site-Directed Mutagenesis of the Heterotrimeric Killer Toxin Zymocin Identifies Residues Required for Early Steps in Toxin Action. *Appl Environ Microbiol* 80:6549–6559. doi: 10.1128/AEM.02197-14.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo evidencia o potencial antibiótico de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA92, que em testes em meio líquido e sólido, mostrou combater a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase mesma em baixas concentrações de β -glucanases. Além disso, em testes realizados verificou-se baixa toxicidade das mesmas.

Com este projeto, almejamos futuramente o desenvolvimento de um medicamento a base de micocinas de *W. anomalus*.

