



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

**LANA RUBIA BACKES ROSSETO**

**SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE  
SECREÇÃO VAGINAL FRENTE ÀS MICOCINAS  
DE *Wickerhamomyces anomalus***

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

**CASCAVEL – PR  
2021**

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

Rosseto, Lana Rubia Backes

Susceptibilidade de cepas de Candida albicans isoladas de secreção vaginal frente às micocinas de Wickerhamomyces anomalus : Susceptibilidade de cepas de Candida albicans isoladas de secreção vaginal frente às micocinas de Wickerhamomyces anomalus / Lana Rubia Backes Rosseto; orientador(a), Rinaldo Ferreira Gandra, 2021.  
30 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, 2021.

1. Wickerhamomyces anomalus. 2. Micocinas. 3. Candida albicans. I. Gandra, Rinaldo Ferreira. II. Título.

**LANA RUBIA BACKES ROSSETO**

**SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE  
SECREÇÃO VAGINAL FRENTE ÀS MICOCINAS  
DE *Wickerhamomyces anomalus***

Trabalho apresentado à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, ao Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na linha de Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde como requisito para exame de Defesa.

**Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra**

**CASCADEL – PR  
2021**

**LANA RUBIA BACKES ROSSETO**

**SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE  
SECREÇÃO VAGINAL FRENTE ÀS MICOCINAS DE  
*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. Dr. André Gasparetto  
*Universidade Estadual de Maringá*  
**UEM**



---

Prof. Dr. Carla Brugin Marek  
*Universidade Estadual do Oeste do Paraná*  
**UNIOESTE**

## LANA RUBIA BACKES ROSSETO

### BIOGRAFIA RESUMIDA

Lana Rubia Backes Rosseto, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida no dia 05 de novembro de 1994, graduada em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em agosto de 2017. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2018. 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.

# SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE SECREÇÃO VAGINAL FRENTE ÀS MICOCINAS DE *Wickerhamomyces anomalus*

## Resumo

As micocinas são substâncias que demonstram um potencial de afetar fungos ou bactérias sensíveis. *Wickerhamomyces anomalus* é uma levedura produtora de micocinas que possui um grande potencial biotecnológico, sendo altamente competitiva em muitos habitats, pois é adaptável a uma ampla gama de condições de crescimento. Assim, são alvos de estudos em diferentes áreas, incluindo meio ambiente, indústria e ciências médicas. As leveduras do gênero *Candida albicans* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. E com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência, à ação de antifúngicos. Devido a essa grande problemática de resistência, novas alternativas de tratamentos vêm sendo estudadas. Este trabalho tem como objetivo verificar a inibição de *C. albicans* isoladas de secreção vaginal por micocinas produzidas por *W. anomalus*. Foram realizados testes em meio sólido e testes de microdiluição, onde as micocinas se mostraram eficiente inibindo o crescimento de *C. albicans*. Testes de hemólise e irritação em modelo organotípico, que evidenciaram que as micocinas produzidas por *W. anomalus* são seguras e não irritantes. Assim os resultados deste trabalho podem fornecer evidências científicas para a aplicação de micocinas na produção de novas alternativas antifúngicas.

## Palavras chaves

*Wickerhamomyces anomalus*; micocinas; *Candida albicans*;

**SUSCEPTIBILITY OF STRAINS OF *Candida albicans* ISOLATED VAGINAL  
SECRETION IN FRONT OF MYCOCINS  
DE *Wickerhamomyces anomalus***

**Abstract**

Mycocins are substances that show a potential to affect sensitive fungi or bacteria. *Wickerhamomyces anomalus* is a mycocins producing yeast that has great biotechnological potential and is highly competitive in many habitats as it is adaptable to a wide range of growing conditions. Thus, they are targets of studies in different areas, including environment, industry and medical sciences. *Candida albicans* yeasts are of great importance because of the high frequency with which they colonize and infect the human host. And often, fungal infections are difficult to treat, a fact related to the acquisition by their etiologic agents of antifungal resistance. Due to this great resistance problem, new treatment alternatives are being studied. The objective of this work is to verify the inhibition of *C. albicans* isolated from vaginal secretion by *W. anomalus*. Tests were performed in solid medium and microdilution test, where the mycocins were efficient inhibiting the growth of *C. albicans*. Hemolysis and irritation tests in organotypic model, which showed that the mycocins produced by *W. anomalus* is safe and no irritating. Thus, the results of this work may provide scientific evidence for the application of mycocins in the production of new antifungal alternatives.

**Key words**

*Wickerhamomyces anomalus*; mycocins; *Candida albicans*;

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas</b> .....	6
<b>Lista de figuras</b> .....	7
<b>Introdução</b> .....	8
<b>Revisão bibliográfica</b> .....	9
Leveduras <i>Killer</i> e <i>Wicherhamomyces anomalus</i> .....	9
<i>Candida albicans</i> .....	11
<b>Objetivos</b> .....	14
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos.....	14
<b>Materiais e Métodos</b> .....	15
<b>Resultados e Discussão</b> .....	20
<b>Considerações finais</b> .....	25
<b>Referências bibliográficas</b> .....	26



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo.....	19
Tabela 2. Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos.....	19

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido.....	20
Figura 2. Teste de microdiluição sobrenadante.....	21
Figura 3. Teste de microdiluição extrato celular.....	21
Figura 4. Ação hemolítica das micocinas.....	23
Figura 5. Teste de irritação em modelo organotípico.....	23

## INTRODUÇÃO

Em 1963, Bevan e Makower descobriram o fenótipo *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*. Desde então, outras leveduras foram descobertas com o mesmo potencial. As leveduras *killer* são capazes de secretar uma substância conhecida por toxina *killer* ou micocinas, que são capazes de inibir outros micro-organismos, isso ocorre no habitat natural como uma forma de competição entre as espécies pela garantia de espaço e nutrientes.

*Wickerhamomyces anomalus* (*W. anomalus*) é uma levedura amplamente distribuída no ambiente, com grande potencial biotecnológico e altamente competitivo em muitos habitats, pois é adaptável a diversas condições de crescimento, como condições extremas de pH, temperatura e osmolaridade. Devido a essas características e à sua propriedade *killer*, esta levedura vem sendo utilizada em vários processos industriais, principalmente na indústria alimentícia como controle de fungos patogênicos, pós-colheita em frutas, legumes e grãos de cereais.

Biossíntese de compostos voláteis e micocinas são os principais mecanismos de ação do sistema *killer* de *W. anomalus*. Devido a ação das micocinas em glucanos, presentes na membrana da célula fúngica, e não presente em células mamíferas este sistema é considerado minimamente tóxico às células humanas. E ainda, essa substância tem baixo potencial à indução de resistência aos microrganismos, características que tornam as micocinas produzidas por *W. anomalus* uma interessante candidata à aplicação médica.

*Candida albicans* foi descoberta por Langenbeck em 1839, e está em destaque devido aos seus diversos fatores de virulência que tornam as infecções de difícil tratamento. Nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*, o que está ligado ao uso indiscriminado de antifúngicos, que por um processo de seleção, tornaram alguns fungos menos susceptíveis a determinadas drogas.

Devido ao grande número de casos de pacientes com *C. albicans* e seu difícil tratamento e efeitos colaterais, as micocinas produzidas por *W. anomalus* podem ser uma alternativa eficaz para o tratamento destas infecções.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Leveduras *killer* e *Wickerhamomyces anomalus*

Estudos feitos por Bevan e Makower (1963) definiram as leveduras *killer* como sendo capazes de promover uma atividade letal sobre outras leveduras sensíveis. Este fenômeno ocorre devido à secreção de substâncias denominadas de micocinas, sendo que a levedura que a secretou é imune à sua própria atividade, mas pode ser susceptível a ação *killer* de outras leveduras. São caracterizadas por serem de natureza proteica ou glicoproteica, de baixo peso molecular e demonstrarem potencial de afetar outros micro organismos (SCHMITT; BREINIG, 2002; TAY; LIM; TAN, 2014).

O fenômeno *killer* de leveduras deriva da atividade letal de micocinas segregadas por cepas autoimunes em leveduras sensíveis, 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*, que foram 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*. Sendo assim, classificou-se a ocorrência de três fenótipos distintos de leveduras: *killer*, sensível e neutro (BEVAN; MAKOWER, 1963).

Outras leveduras então 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 anômala* (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).

*W. anomalus* é uma levedura considerada 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, o que significa que é um agente bem caracterizado e conhecido por não provocar doenças em indivíduos saudáveis e que possuem o mínimo risco aos seus manipuladores e ao meio ambiente; 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 de algumas cepas da levedura é a sua alta atividade antimicrobiana (WALKER, 2011). 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. O mecanismo de ação das micocinas é frequentemente atribuído à hidrólise de  $\beta$ -1,3-glucano ou  $\beta$ -1,6-glucano, e como este é o principal polímero da célula fúngica, gera danos na parede celular, vazamento dos componentes citoplasmáticos e conseqüentemente a morte celular. O glucano é um importante polímero na membrana da célula fúngica, 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).

Cepas de *W. anomalus* é altamente competitiva 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 as 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. Além disso, é capaz de secretar as enzimas, como invertase e peptidase (WALKER, 2011; OLSTORPE; PASSOTH, 2011; SATORA *et al.*, 2014).

A *W. anomalus* têm a capacidade de utilizar com rapidez os nutrientes disponíveis e de suportar uma série de condições extremas, se tornando ferramentas biotecnológicas úteis. É utilizada como conservantes naturais, 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 capazes de 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).

Estudos feitos mostram a atividade inibitória de micocinas produzidas por *W. anomalus* sobre as espécies de leveduras *Candida albicans*, as quais possuem importância clínica devido à sua capacidade de provocar infecções mucocutânea e sistêmica. Desta forma, evidenciando o potencial de *W. anomalus* para aplicação na medicina através do desenvolvimento de produtos antimicrobianos (GUO *et al.*, 2013; TAY *et al.*, 2014).

### ***Candida albicans***

Segundo Sidrim e Rocha, a primeira documentação de leveduras do gênero *Candida spp.* como patógeno foi realizada por Langenbeck em 1839. Ele observou e isolou o micro-organismo, que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, a *Candida albicans*. *Candida spp* é classificada taxonomicamente no reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcacea.

Os principais fatores de virulência desta levedura são: capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, que degradam os tecidos do hospedeiro; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão a células e tecidos; formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida spp.*; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular e

resistência ao peróxido de hidrogênio (CALDERONI; FONZI, 2001; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). A candidíase invasiva é uma doença emergente nos países em desenvolvimento e hoje é considerada a quarta causa mais comum de infecção da corrente sanguínea em países desenvolvidos e a terceira causa mais comum de infecção sistêmica nas Unidades de Terapia Intensiva (BHATTACHARYYA et al, 2013).

A candidíase vulvovaginal é a segunda causa mais frequente de vulvovaginite e estima-se que 75% das mulheres terão um episódio de candidíase vulvovaginal ao longo de suas vidas, sendo que 40% a 50% destas teriam a segunda infecção e cerca de 5% poderiam adquirir padrão crônico, com episódios de repetição. *Candida spp* é responsável por 15% a 25% dos casos de vaginites, sendo causada pelas leveduras que habitam a mucosa vaginal e digestiva e que crescem em meio favorável ao seu desenvolvimento. *C. albicans* está presente como microbiota vaginal normal em 15% a 20% das mulheres adultas saudáveis e em 30% a 40% das grávidas. Nos Estados Unidos, a incidência de vaginite micótica dobrou entre 1989 e 1990, coincidindo com aumento de 80% no uso de antimicóticos no mesmo período (FOSTER, 1993; SOBEL, 1997; GALLE; GIANINNI, 2004).

Antibióticos intravenosos têm sido associados a infecções por *Candida* desde 1945. As bactérias que normalmente habitam a flora intestinal inibem o crescimento de fungos. Alterando-se a flora bacteriana intestinal com o uso de antibióticos sistêmicos, os fungos têm a possibilidade de crescer e invadir tecidos profundos, vasos sanguíneos e linfáticos, resultando em uma doença disseminada, principalmente nos indivíduos imunocomprometidos. Além disso, mulheres com vida sexual ativa possuem maior predisposição a infecções vaginais, principalmente por leveduras do gênero *Candida*, a secreção vaginal anormal e outros sintomas relacionados são manifestações comuns nestas pacientes. Também se têm relatado que mulheres no período da menopausa possuem uma maior chance de obter infecções por estas leveduras devido ao aumento do pH vaginal, facilitando assim a colonização desses fungos (GODOY et al, 2003; DE OLIVEIRA; MAFFEI; MARTINEZ, 2001).

Com freqüência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004; LIMA et al, 2006). Após a introdução dos azóis para tratamento de infecções fúngicas, que possuem uma bioviabilidade oral e uma baixa incidência de efeitos colaterais, uma nova era começou. E após um longo período observou-se que o tratamento com azóis estava fracassando. Estudos relataram que um dos motivos para este fracasso ocorreu devido à resistência das leveduras do gênero *Candida* aos agentes antifúngicos (NUCCI; COLOMBO, 2002).

Para o tratamento de candidíase vulvovaginal inicialmente para um regime de supressão utiliza-se antifúngicos orais, como Fluconazol ou um azólico tópico (FEUERSCHUETTE et al, 2010). Porém seguidas infecções e exposições recorrentes aos azóis, cepas mostraram-se resistentes ao tratamento com Fluconazol (SANTOS JR et al, 2005). A anfotericina B, atualmente, o antifúngico mais eficaz disponível, em casos de infecções generalizadas, seu uso é restrito pela sua toxicidade sistêmica e local. A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes. A nistatina é um fungistático e fungicida isolado de cepas de *Streptomyces noursei*, seu espectro de ação e mecanismo são semelhantes aos da anfotericina B, porém é altamente tóxica quando usada por via sistêmica ou intravítrea (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003).

Nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*. Este fenômeno está ligado de alguma forma ao uso indiscriminado de antifúngicos, que por um processo de seleção, tornaram alguns fungos menos susceptíveis a determinadas drogas. As infecções por leveduras do gênero *Candida* mais susceptíveis as drogas estão gradativamente sendo substituídas por infecções causadas por cepas mais resistentes e assim os fracassos nos tratamentos estão levando os cientistas a pesquisarem drogas de espectro maior, que por sua vez, causam maiores efeitos colaterais para os pacientes (LINARES et al, 2003; PANIZZO; PÉREZ; MANISCALCHI, 2000). Neste contexto, as micocinas produzidas por *W. anomalus* também podem ser uma alternativa efetiva.



## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar a atividade inibidora do crescimento das micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* frente a cepas de *Candida albicans* isoladas de secreção vaginal.

### Objetivos específicos

- Obter micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40);
- Quantificar a enzima  $\beta$ -glucanase nas micocinas presentes no sobrenadante e extrato bruto da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) pelo método da Laminarina;
- Avaliar a atividade inibidora do crescimento das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) em meio sólido;
- Avaliar a atividade inibidora do crescimento das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) pelo método de microdiluição;
- Avaliar a atividade inibidora do crescimento das micocinas presentes no extrato celular (extrato bruto) da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) pelo método de microdiluição;
- Avaliar a toxicidade das micocinas produzida por *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) por hemólise;
- Avaliar a segurança das micocinas produzida por *Wickerhamomyces anomalus* (WA 40) pelo ensaio de irritação em modelo organotípico.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cepas de *Candida albicans***

Utilizou-se 30 cepas de *Candida albicans* isoladas de secreção vaginal e 1 cepa ATCC 90028 armazenadas na micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE) no Hospital Universitário do Oeste do Paraná. As cepas foram recuperadas em caldo brain heart infusion (BHI) e semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose durante todo o estudo.

### ***Wickerhamomyces anomalus***

A levedura de *Wickerhamomyces anomalus* molecularmente identificada como WA40, depositada no GenBank (número de acesso: KT580794 - Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), a qual foi coletada às margens do Lago de Itaipu, localizado no estado do Paraná, Brasil. Atualmente faz parte da micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE).

### **Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus***

Para a produção das micocinas a cepa WA40 foi repicada em agar Sabouraud Modificado (2% Agar, 1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico), pH 4,7 ± 2, incubado a 32°C por 48 horas, após as 48 horas, estas foram inoculadas em garrafas de Roux contendo 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 ± 2, incubado a 25°C por 5 dias. Em seguida o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 minutos, obtendo o sobrenadante, que então foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4°C.

Já para a obtenção do extrato bruto, após a centrifugação do caldo, as células precipitadas foram lavadas com água destilada e centrifugadas a 6000 rpm/10 minutos, a água de lavagem foi desprezada e o extrato bruto foi transferido para um erlenmeyer (previamente pesado) e passou por secagem em estufa a 35°C por aproximadamente 7 dias. Após este período o erlenmeyer foi novamente pesado e

descartado o seu peso inicial, pois para cada 5 gramas de massa celular, foi adicionado 100mL de líquido de coca estéril (Bicarbonato de sódio e Cloreto de sódio, pH 9,1), agitado até a massa celular se solubilizar e foi armazenado a 4°C/7 dias. A massa celular foi então centrifugada a 6000 rpm/10 minutos, o sobrenadante foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4°C.

### **Determinação β-Glucanase pelo método da Laminarina**

A quantificação de proteínas foi realizada a partir do método baseado na absorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 proposto por Bradford (BRADFORD, 1976). 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 realizado curva padrão a cada determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de soro albumina bovino (BSA), sendo que a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/mL.

A determinação de β-glucanases foi realizada de acordo com Miller (1959) 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 WA40 e 125 µl de laminarina. Incubou-se a solução a 37°C por 10 minutos. Após este período, 100 µl da solução foi adicionado 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 duplicata. 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 atividade específica de β-glucanases foi calculada dividindo a concentração de atividade enzimática pela concentração de proteínas.

### **Atividade antimicrobiana em meio sólido**

Foram preparados dois meios de ágar Mueller Hinton, um controle e outro teste. O controle é constituído apenas de ágar Mueller Hinton (conforme orientações

do fabricante), já o teste compõe-se por 15mL de meio e de sobrenadante contendo micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40. Ambos os meios, controle e teste, foram vertidos em placa de Petri. Com alça calibrada de 1 µL, foi então semeado a cepa de *Candida albicans* ATCC (90028), previamente ajustadas à concentração  $10^3$  UFC/mL, no controle e no teste, posteriormente incubou-se a 32°C por 48 horas.

### **Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição**

Para os testes de microdiluição utilizou-se o método M27-A3 - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com modificações. Utilizou-se microplacas contendo 96 poços, dispostos em colunas (enumeradas de 1 a 10) e linhas (com letras alfabéticas, de A a H). As células de *Candida albicans* foram previamente ajustadas à concentração  $10^3$  UFC/mL, homogeneizadas em 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH) em tubos de ensaio e então distribuídas (100 µL) nas colunas. Cada coluna correspondeu a uma cepa teste de *Candida albicans*. O sobrenadante e extrato bruto foram diluídos em água destilada estéril (em tubos falcons) e adicionados aos poços da linha B a F (100 µL), resultando nas seguintes diluições: puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Nas linhas G e H, foram realizados os controles negativo (contendo 200µL de caldo MH estéril) e positivo (contendo 200 µL caldo MH onde foram inoculadas células de *Candida albicans* ajustadas à concentração  $10^3$  UFC/mL), respectivamente. Após o término do procedimento, a placa foi lacrada e incubada a 32°C por 48 horas. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas, de modo que a última diluição onde havia inibição do crescimento bacteriano foi tomada como resultado, em comparação com os controles positivo e negativo. Alíquotas de 10 µL foram extraídas dos poços-resultado e semeadas em ágar Sabouraud para confirmar a completa inibição. O teste foi realizado em duplicata.

### **Teste de hemólise**

A citotoxicidade em eritrócitos foi realizada conforme Paris *et al.* (2016). Foi coletado sangue de um indivíduo saudável em tubo contendo EDTA (Ethylenediaminetetraacetic 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 contendo micocinas: puro, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 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. Foram realizados controle de eritrócitos íntegros (eritrócitos 4% e PBS) e controle de hemólise (eritrócito 4% e ácido acético 4%).

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

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

Sendo:

A: Absorbância

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

### **Ensaio de irritação em modelo organotípico**

Os ovos de galinha fecundados de aproximadamente 10 dias foram selecionados a partir da visualização da membrana corioalantóide, as membranas foram avaliadas com finalidade de verificar danos, o que causaria a rejeição do ovo no experimento. Também foram descartados os ovos em que não haja embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade). Com o auxílio de tesouras planas foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente e posteriormente foi retirada a primeira membrana de aspecto esbranquiçado para deixar descoberta à membrana corioalantóide. O sobrenadante contendo micocinas (pura) foi aplicado com auxílio de uma micropipeta diretamente sobre a membrana corioalantóide (100 µL) e permaneceu em contato com a membrana durante 20 segundos, após o período de contato, a membrana foi lavada com salina para retirar o produto e realizada a avaliação da membrana corioalantóide. Como controle positivo, os ovos foram tratados com NaOH (0,1 N) como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e coagulação). E como controle negativo utilizou-se um ovo com membrana íntegra.

Após a aplicação do sobrenadante contendo micocinas, a membrana foi observada durante 5 minutos e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sintomas de irritação, ou seja, hiperemia, hemorragia e/ou coagulação segundo a tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo

Reação	Tempo		
	$T \leq 30s$	$30s \geq T \leq 2min$	$2min \geq T \leq 5min$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 2 – Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos

Índice	Categorias
$N < 1$	Praticamente não irritante
$1 \leq N \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 \leq N \leq 9$	Moderadamente irritante
$N \geq 9$	Irritante

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A laminarina, isolada da alga *Laminaria digitata* e utilizada neste estudo para a determinação da atividade de  $\beta$ -glucanases, possui apenas 10% de grau de ramificação e tem sido muito utilizada como substrato para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases (BAUERMEISTER et al., 2010). No presente estudo, a atividade específica de  $\beta$ -glucanases foi de 4,69U/mg no sobrenadante e 2,47 U/mg no extrato celular. Resultado superior ao encontrado por Calazans et al. (2020) onde encontrou 0,40 U/mg de atividade específica em micocinas produzidas por *W. anomalus*.

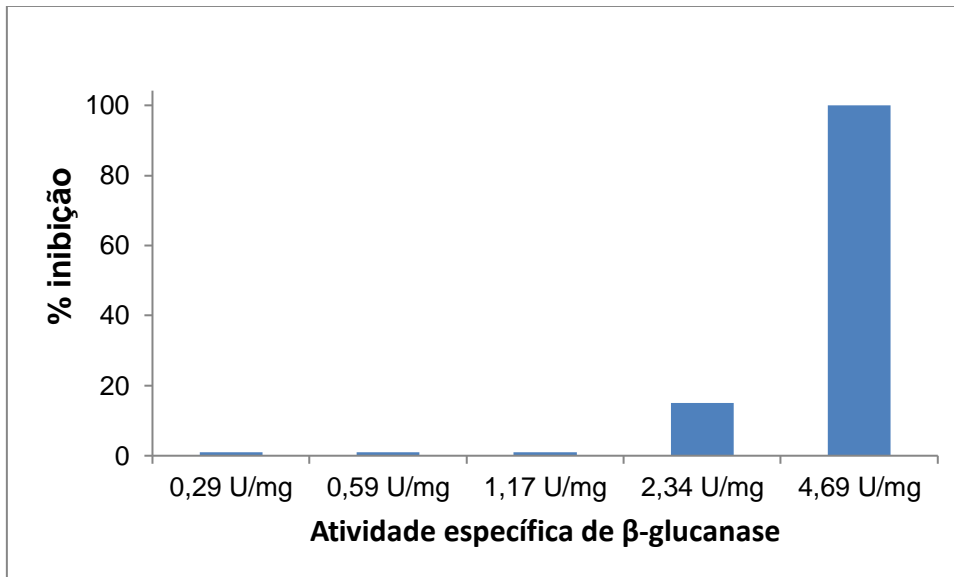
Como teste prévio para a verificação da atividade antimicrobiana das micocinas produzidas por *W. anomalus*, foi realizado o teste do meio sólido, onde verificou a inibição do crescimento da cepa de *C. albicans* quando esta foi semeada em Agar contendo o sobrenadante com micocinas WA40 contendo 703,5 U/mg de  $\beta$ -glucanase. No lado controle foi adicionado sobre Agar Miller Hinton e no lado teste, Agar Miller Hinton e sobrenadante contendo micocinas WA40. No lado teste não houve crescimento da cepa de *Candida albicans* (**figura1**).



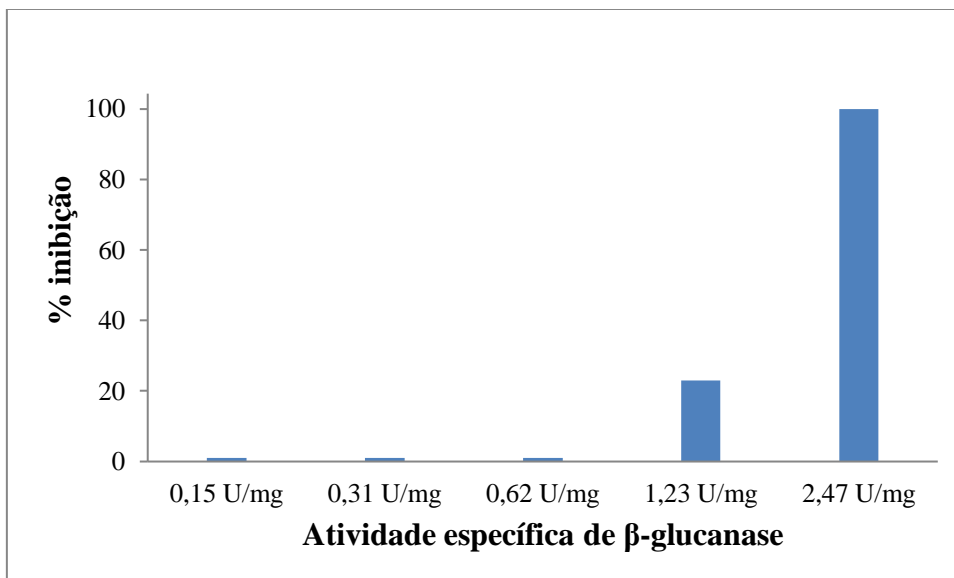
**Figura 1:** Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. Lado TESTE constituído de sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 dissolvido em ágar Mueller Hinton e cepa de *Candida albicans* inoculada pelo método de superfície. Lado CONTROLE constituído de Agar Miller Hinton e cepa de *Candida albicans* inoculada pelo método de superfície.

No teste de microdiluição com as micocinas presentes no sobrenadante observou-se inibição do crescimento das 30 cepas de *Candida albicans* utilizadas, onde 100% das cepas foram inibidas em contato com sobrenadante WA40 puro com atividade específica de  $\beta$ -glucanase 4,69 U/mg e aproximadamente 15% das cepas foram inibidas em contato com o sobrenadante diluído 1:2 com atividade específica

de  $\beta$ -glucanase 2,345 U/mg durante 48 horas respectivamente (**figura 2**). Já no teste de microdiluição com o extrato de células, observou-se inibição do crescimento das 30 cepas de *Candida albicans* utilizadas, observou-se que a inibição das cepas em contato, durante 48 horas, com o extrato bruto WA 40 puro (2,47 U/mg de  $\beta$ -glucanase) e com extrato bruto diluído 1:2 (1,235 U/mg de  $\beta$ -glucanase) foi de 100% e 23% respectivamente (**figura 3**).



**Figura 2:** Teste de microdiluição utilizando o sobrenadante, 100% das cepas de *C. albicans* foram inibidas pelas micocinas presentes no sobrenadante do *W. anomalus* na concentração puro.



**Figura 3:** Teste de microdiluição utilizando o extrato de células, 100% das cepas de *C. albicans* foram inibidas pelas micocinas presentes no extrato celular do *W. anomalus* na concentração puro.

Hodgson *et al.* (1995) observaram a ação direta de micocinas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* e *Williopsis mrakii* frente a cepas clinicamente importantes de *Candida*. E Paris *et al.* (2016) encontrou resultados semelhantes ao



testar micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* sobre cepas patogênicas de *C. albicans*.

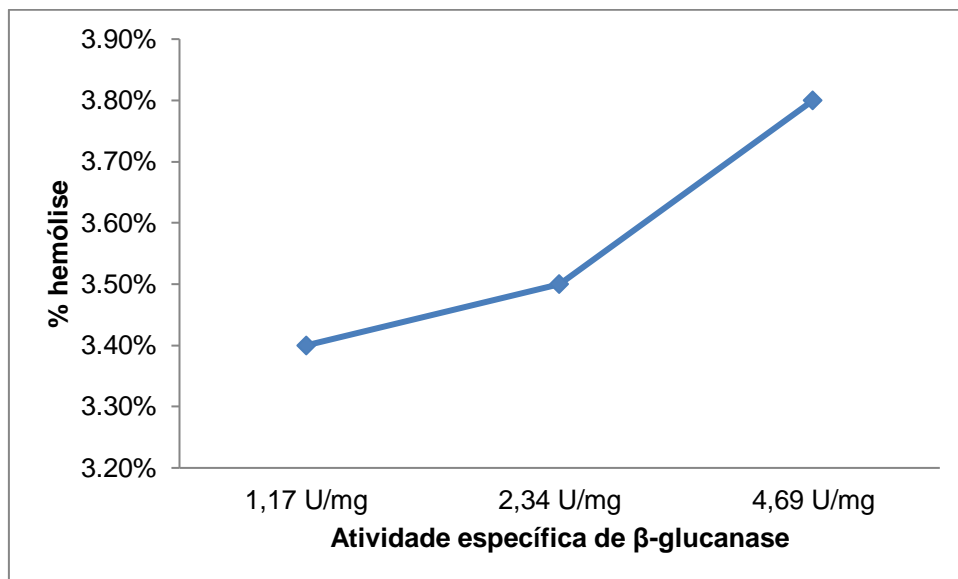
Acredita-se que o principal mecanismo de ação das micocinas estejam atribuídos à hidrólise do glucano presente na parede celular dos microorganismos, o que pode gerar danos a parede, extravasando assim os componentes citoplasmáticos e resultando na morte celular (MUCCILLI et al., 2013). As  $\beta$  – glucanases atuam em substratos constituídos de sequências lineares de unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 contendo uma extremidade terminal não redutora, sendo permitido um grau moderado de substituições (BAUERMEISTER et al., 2010). Tay et al. (2014) isolaram e identificaram micocinas de *W. anomalus* como  $\beta$ -1,3 glucanase por análise espectrométrica de massa e confirmaram a sua atividade.

A laminarina, isolada da alga *Laminaria digitata* e utilizada neste estudo para a determinação da atividade de  $\beta$ -glucanases, possui apenas 10% de grau de ramificação e tem sido muito utilizada como substrato para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases (BAUERMEISTER et al., 2010).

No presente estudo, em relação ao sobrenadante foram obtidos atividade enzimática de 0,275 U/min/mL e concentração de proteínas de 0,0586 U/mg, sendo assim, a atividade específica de  $\beta$ -glucanases foi de 4,69 U/mg, e para o extrato bruto foram obtidos atividade enzimática de 0,084 U/min/mL e concentração de proteínas de 0,034 U/mg, sendo assim, a atividade específica de  $\beta$ -glucanases foi de 2,47 U/mg.

Micocinas já foram estudadas em testes de toxicidade e relatadas na literatura como não sendo hemolíticas. Segundo Rangel et al. (1997) hemólise de até 40% mostram-se como de baixa toxicidade. Leveduras de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* capazes de inibir microorganismos patogênicos também foram testadas mostrando não serem hemolíticas (CEUGNIEZ et al., 2015).

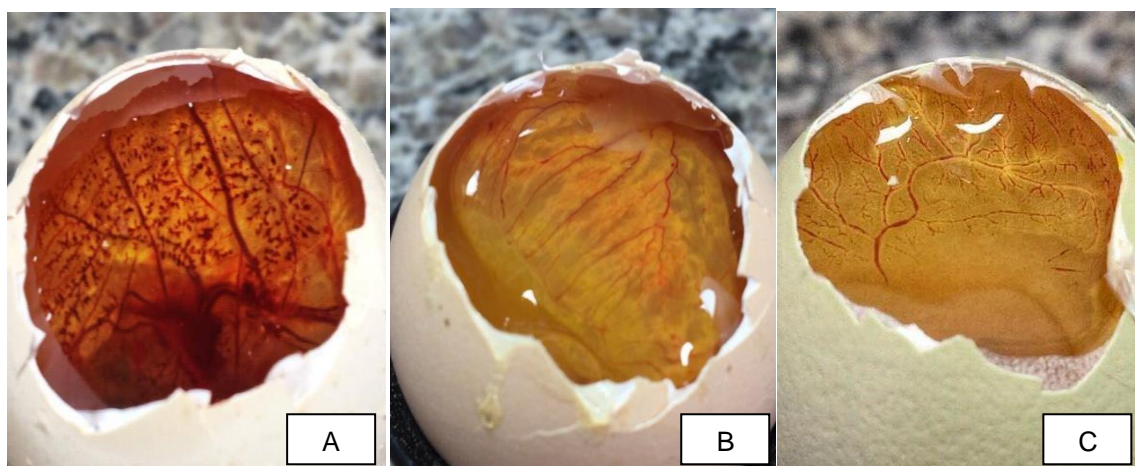
As micocinas WA40 presentes no sobrenadante apresentou baixa toxicidade onde 4,69 U/mg de atividade específica de  $\beta$ - glucanase apresentou apenas 3,8% de hemólise e 2,34 U/mg apresentou 3,5% de hemólise (**figura 4**). Estudo realizado por Paris et al. (2016) testou micocinas de *W. anomalus*, mostrando atividade inibitória sobre cepas de *C. albicans* e obteve resultados semelhantes ao deste trabalho em relação a baixa citotoxicidade.



**Figura 4:** Ação hemolítica das micocinas obtidas de WA40 sobre eritrócitos humanos.

A membrana corioalantóide (CAM) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada. Suas características estruturais fazem com que sejam consideradas similares a tecidos altamente vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes.

No teste de irritação em modelo organotípico, foi dada uma pontuação em função do tempo (T) de aparição das diferentes lesões, e o teste realizado com as micocinas WA40 pontuou em 5 onde apresentou apenas coagulação depois de 2 minutos de contato com a membrana, que a classifica como ligeiramente irritante (**figura 5**).



**Figura 5:** Controle Positivo (A) membrana altamente irritada após aplicação de NaOH (0,1 N). Teste com micocinas WA40 (B) aparecimento de coagulação após 2 minutos de observação. Controle negativo (C) membrana íntegra.

O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke (1985), aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA, na avaliação da segurança de diferentes tipos de produtos cosméticos e farmacêuticos (VINARDELL, MITJANS 2006; MURILLO et al., 2003; VINARDELL, GARCÍA, 2000). Pereira (2008) encontrou resultados semelhantes ao testar uma preparação cosmética, onde a formulação apresentou-se ligeiramente irritante. O ensaio em membrana corioalantóide é uma alternativa viável, utilizado para avaliar a irritação ocular de produtos cosméticos (STEILING *et al.* 1999).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo evidenciou a potencial atividade antimicrobiana de micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*, que em testes em meio líquido e sólido mostraram-se eficientes contra cepas de *Candida albicans*. Além disso, o estudo ainda evidenciou sua ação rápida e segura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004.
- BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M.I.; GIESE, E.C.; HUIBERT, R.F.; BARBOSA, A.M. Fungal  $\beta$ -1,3-Glucanases: production and biotechnological applications. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.
- BHATTACJHARYYA, S.; GUPTA, P.; BANERJEE, G.; JAIN, A.; SINGH, M. In-vitro Inhibition of Biofilm Formation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Heat Stable Compounds in Culture Filtrate of *Aspergillus flavus*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p. 2167-2169, 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.
- CALAZANS, G.F.; SILVA, J.C.; DELABENETA, M.F.; PARIS, A.P.; YASSUDA FILHO, P.; AULER, M.E.; MENOLLI, R.A.; PAULA, C.R.; SIMÃO, R.C.G.; GANDRA, R.F. Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. **Food Science and Technology**, Campinas, 2020.
- 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, maio 2014.
- CEUGNIEZ, 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 Microbiology**, v.52, p.177-184, 2015.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, v. 22, n. 15, p. 8-9, 2008.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20-U. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2010.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- DE OLIVEIRA, R.D.R.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R. Infecção Urinária Hospitalar Por Leveduras Do Gênero *Candida*. Trabalho Realizado No Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto, SP, 2001.
- FEUERSCHUETTE, O. H. M.; SILVEIRA, S. K.; FEUERSCHUETTE, I.; CÔRREA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA**, v. 38, n. 2, p. 31-36, 2010.

FOSTER, D. C. Vulvitis and vaginitis. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 5, p. 726-32, 1993.

GALLE, L.C.; GIANINNI, M.J.S.M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229-36, 2004.

GIOLO, M.P; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, 2003.

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

HODGSON, V.J; BUTTON, D; WALKER, G.M. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. **Microbiology**, v. 141, p. 2003–2012, 1995.

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.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; TÜRELI, A. E. In vitro activity of panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 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- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 85–91, 2011.

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.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LINARES M.J.; CIRAK, M.Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S.; Use of molecular methods in identification of *Candida* Species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, 2003.

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.

MURILLO, G. et al. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicología**, v.20, n. 3, p.187-192, 2003.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, 2002.

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

PANIZZO, M.M.; PÉREZ, C.Y.; MANISCALCHI, M.T. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y resurrente. **BSVM**, v. 20, n. 1, 2000.

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.; 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.

PEREIRA, G. G. Obtenção de nanoemulsões O/A a base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octil a e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, 138f, 2008.

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.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*.**Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

SANTOS JR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais de ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189-197, 2005.

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.

SERRACARBASSA, P.D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 5, 2003.

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.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 21-266, 2004.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1896-903, 1997.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; DE SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in vitro**, v. 13, p. 375-384, 1999.

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.

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.

VINARDELI, M.P.; GARCIA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology In Vitro**, v.14, n. 14, p.551- 556, 2000.

VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation by commonly used laboratory solvents. **Toxicology In Vitro**, v.20, p. 1066- 1070, 2006.



