



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

**AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS SOBRE FUNGOS ANEMÓFILOS ISOLADOS
DE UTI NEONATAL**

JESSICA VIEIRA

CASCAVEL-PR

2022

JESSICA VIEIRA

**AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS SOBRE FUNGOS ANEMÓFILOS ISOLADOS
DE UTI NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa “Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Rinaldo Ferreira Gandra.

CASCADEL-PR
2022

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

Vieira, Jessica
AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS SOBRE FUNGOS ANEMÓFILOS
ISOLADOS DE UTI NEONATAL / Jessica Vieira; orientador
Rinaldo Ferreira Gandra. -- Cascavel, 2022.
43 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2022.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Infecção Hospitalar. 3.
Fungos anemófilos. I. Ferreira Gandra, Rinaldo, orient. II.
Título.

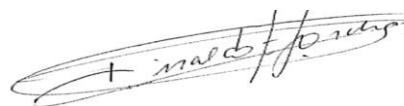
JESSICA VIEIRA

**AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS SOBRE FUNGOS ANEMÓFILOS ISOLADOS
DE UTI NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, campus de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa "Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Rinaldo Ferreira Gandra.

BANCA EXAMINADORA:



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



Dr.ª. Luciana da Silva Ruiz Menezes
Adolfo Lutz CLR II



Dr.ª. Thais Soprani Ayala
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE

Cascavel-PR

2022

i

JESSICA VIEIRA

BIOGRAFIA RESUMIDA

Jessica Vieira, nascida em 13 de abril de 1993, no município de Cascavel, Paraná, Brasil. Graduada em Biomedicina na Universidade Paranaense - UNIPAR, *campus* de Cascavel em janeiro de 2015. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2020. 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.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”
Fernando Pessoa*

A Deus,
À minha família.

AGRADECIMENTO

Pelo amor presente, pela palavra que orienta e pelo amparo que refocila o espírito nos momentos de exaustão, primeiramente agradeço a Deus.

Ao meu pai, Clodimar, pelo suporte e carinho. E à minha mãe, Marisa, em memória, pelo exemplo de perseverança e determinação. Pelo apoio e amor incondicional no incentivo aos estudos. Obrigada por se dedicarem à minha educação e por me guiarem sempre por bons caminhos.

À minha irmã Letícia, por ser ombro amigo e fonte de ânimo. Você é um presente.

Ao meu marido, Thiago, por segurar minha mão em toda esta trajetória. Compreensivo nas ausências e dias de cansaço, sendo válvula propulsora e porto seguro.

Às minhas colegas de laboratório Eloiza, Rafaela, Jéssica C. e Marilu, que trouxeram leveza aos dias de trabalho intenso. E que, compartilharam comigo do conhecimento adquirido nesta jornada.

Ao meu orientador, Rinaldo, pela oportunidade, paciência no ensinar e por me permitir fazer parte do seu legado na ciência.

E, por fim, aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, pelo conhecimento concedido.

ACÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS SOBRE FUNGOS ANEMÓFILOS ISOLADOS DE UTI NEONATAL

RESUMO

Os fungos são capazes de colonizar diferentes substratos e habitats, sendo o ar atmosférico o meio de dispersão mais utilizado e mais bem sucedido dentre estes organismos. Os fungos anemófilos, com sua capacidade de se estabelecer e contaminar o ar, diminuem a qualidade de vida dos organismos que ali circulam. As infecções hospitalares fúngicas invasivas têm surgido progressivamente como uma fonte relevante nos quesitos morbidade e mortalidade em pacientes, principalmente aqueles imunossuprimidos. O amplo espectro de atividade antimicrobiana e grande estabilidade levaram o uso de *Wickerhamomyces anomalus* como um agente de biocontrole, uma vez que poderia ser classificado como um microrganismo de baixo risco. Além disso, já é comprovada a acção antimicrobiana de micocinas produzidas a partir desta levedura em microrganismos eucariotos e procariotos. Partindo disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a inibição de fungos anemófilos isolados em UTI Neonatal por micocinas produzidas por *W. anomalus*. O sobrenadante da cultura de *W. anomalus* contendo micocinas mostrou atividade de β -glucanases de 4,2 U/mg. Para o monitoramento fúngico e o teste de inibição em meio sólido, foi utilizada a técnica de sedimentação passiva em placas de Petri expostas na UTI Neonatal, por 15 minutos, a 1 m do chão e distantes das paredes. O teste foi constituído por uma placa controle contendo Ágar Sabouraud Dextrose, e outra composta pelo meio de cultura e sobrenadante de micocinas de *W. anomalus*. Em seguida, após a incubação, foi observado o crescimento e/ou inibição dos fungos coletados. Observou-se nas placas controle o crescimento de 15 gêneros: *Aureobasidium* spp., *Curvularia* spp., *Emmonsia* spp., *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Scedosporium* spp., *Chrysosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp, sendo o *Cladosporium* spp. o mais incidente no período analisado, 40% (86 UFC), enquanto nas placas teste não houve o crescimento de microrganismos. Sendo assim, podemos notar o potencial das micocinas de *W. anomalus* no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas.

Palavras-chaves: *Wickerhamomyces anomalus*; micocinas; fungos anemófilos; UTI neonatal.

INHIBITORY ACTION OF MYCOCINS ON AIRBORNE FUNGI ISOLATED FROM NEONATAL ICU

ABSTRACT

Fungi can colonize different substrates and habitats. Atmospheric air is the most used and most successful dispersion environment for these organisms. Airborne fungi, with the ability to establish themselves and contaminate the air, reduce the life quality of the organisms that circulate there. Invasive fungal nosocomial infections have progressively emerged as a relevant source of morbidity and mortality in patients, especially the immunosuppressed patients. The broad spectrum of antimicrobial activity and the great stability led to the use of *Wickerhamomyces anomalus* as a biocontrol agent, since it could be classified as a low-risk microorganism. In addition, the antimicrobial action of mycocins produced from this yeast in eukaryotic and prokaryotic microorganisms is already proven. Based on this, the aim of the present study was to evaluate the inhibition of airborne fungi isolated in a Neonatal ICU by mycocins produced by *W. anomalus*. The mycocin containing *W. anomalus* culture supernatant showed β -glucanase activity of 4.2 U/mg. For fungal monitoring and inhibition test in solid environment, the passive sedimentation technique was used in Petri dishes exposed in the Neonatal ICU, for 15 minutes at 1 m high from the floor and away from the walls. The test consisted of a control plate containing Sabouraud Dextrose Agar, and another composed of culture medium and *W. anomalus* mycocin supernatant. Then, after incubation, the growth and/or inhibition of the collected fungi was observed. The growth of 15 genera was observed on the control plates: *Aureobasidium* spp., *Curvularia* spp., *Emmonsia* spp., *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Scedosporium* spp., *Chrysosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp. *Cladosporium* spp. was the most incident in the analyzed period, 40% (86 UFC). Meanwhile, on the test plates there was no growth of microorganisms. As a result, we can see the potential of *W. anomalus* mycocins in the development of new antimicrobial substances.

Keywords: *Wickerhamomyces anomalus*; mycocins; airborne fungi; neonatal ICU.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Fungos anemófilos e o Ambiente hospitalar.....	13
1.2 Fatores que influenciam na concentração e diversidade de fungos no ar	15
1.3 Cladosporium spp.	16
1.4 Leveduras killer e o Sistema killer.....	17
1.5 Wickerhamomyces anomalus e micocinas.....	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Monitoramento dos fungos anemófilos.....	23
3.1.1 Local e período da amostragem	23
3.1.2 Coleta, isolamento e identificação	23
3.2 Teste para Inibição de Fungos Anemófilos	23
3.2.1 Wickerhamomyces anomalus	23
3.2.2 Produção de micocinas de Wickerhamomyces anomalus.....	24
3.2.3 Determinação da atividade de β -glucanases	24
3.2.4 Teste de inibição em meio sólido.....	25
3.2.5 Atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Monitoramento de fungos anemófilos na UTI Neonatal.....	27
4.2 Inibição de fungos anemófilos por micocinas de Wickerhamomyces anomalus	30
4.2.1 Determinação da atividade de β -glucanases	30
4.2.2 Atividade antimicrobiana em meio sólido	31
4.2.3 Atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição em caldo	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Incidência de fungos anemófilos por estação do ano	18
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Incidência de fungos anemófilos identificados em porcentagem28
- Figura 2** Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. (A) Meio de cultura Ágar Sabouraud (B) Meio de cultura acrescido de 3,4 U/mg de β -glucanases obtidas a partir de *W. anomalus* WA 40 sem crescimento fúngico.....32
- Figura 3** Leitura do teste de macrodiluição mostrando a turvação fúngica nas concentrações de β -glucanases nas quais ocorreram o crescimento de cepas de *Cladosporium* spp.....32
- Figura 4** Teste de susceptibilidade de *Cladosporium* spp. frente às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* presentes no sobrenadante de WA40 em diferentes concentrações de β -glucanases.....33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos anemófilos e o Ambiente hospitalar

Os fungos são um dos grupos de organismos mais abundantes, amplamente distribuídos e difundidos na Terra (NAGEEN et al., 2021). São capazes de colonizar de forma singular diferentes substratos e habitats, como plantas, animais, solo, água e ar. Esses microrganismos podem ser transportados pela água, por insetos, humanos e animais, tendo a capacidade de se dispersar através do ar atmosférico, como os chamados anemófilos, suportando grandes variações de temperatura, umidade, pH e concentrações de oxigênio (ČERNÁ et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018).

Os fungos anemófilos são considerados uma fração dos bioaerossóis, dos quais podem fazer parte os grãos de pólen, as bactérias, os vírus e os esporos de fungos, além de seus fragmentos. Nesse contexto, o uso de bioindicadores para monitoramento ambiental é uma ferramenta valiosa. Eles podem detectar mudanças no ambiente devido a presença de poluentes específicos que, por sua vez, afetam a biodiversidade e espécies particulares de bactérias, fungos ou líquens suspensos no ar (PARMAR; RAWTANI; AGRAWAL, 2016). Também são sensíveis a desordens ambientais, pois apresentam sinais característicos externos de acordo com a concentração do poluente. Estes fungos, como fração de bioaerossóis, também podem ser considerados bioindicadores de poluição do ar, doenças de plantas e reações alérgicas que se expressam por diferentes formas clínicas. Eles apresentam uma ampla faixa de concentração em áreas urbanas de acordo com a interação entre fatores biológicos e ambientais (PESCOTT et al., 2015; SILVA et al., 2020).

Contudo, os fungos anemófilos podem ser considerados poluentes biológicos com capacidade de se estabelecer e contaminar o ar interno de ambientes, diminuindo a qualidade de vida dos organismos que ali circulam (DO NASCIMENTO et al., 2019).

Alguns destes fungos produzem micotoxinas e, quando em contato com o organismo humano, são capazes de desencadear processos alérgicos, irritação em mucosas e pele, infecções fúngicas e promover a exposição de indivíduos sensíveis aos seus propágulos e aos seus metabólitos tóxicos (LOBATO; VARGAS; SILVEIRA, 2009; MEZZARI et al., 2003).

A patogenia das infecções fúngicas respiratórias se dá através da inalação de corpos de propágulos (conídios e/ou esporos) fúngicos inalados durante a respiração. Seu tamanho tem relação direta com o local de deposição no trato

respiratório. Os conídios maiores que 10 µm atingem até a nasofaringe e são associados a sintomas oculares e nasais. Já os conídios menores que 10 µm, principalmente os menores que 6 µm, podem alcançar o trato respiratório inferior, como por exemplo os conídios de *Aspergillus* spp (2-3 µm), que conseguem penetrar até os alvéolos pulmonares (ADHIKARI et al., 2004).

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), segundo o Ministério da Saúde (MS) Portaria nº 2616/98, são aquelas adquiridas após a admissão do paciente, que se manifestam durante a internação, após a alta, ou ainda quando relacionadas à internação ou à procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998), representando uma grande preocupação de saúde no mundo. As fúngicas invasivas surgiram progressivamente como uma fonte relevante nos quesitos morbidade e mortalidade, o que tem ampliado o tempo de permanência dos pacientes em hospitais, provocando o crescimento dos custos para os estabelecimentos de saúde. Isso ocorre, na maioria das vezes, pela dificuldade de se realizar um diagnóstico precoce e seguro, o que garantiria uma terapia rápida e eficaz (MENEGUETI et al., 2015; PEMÁN; ZARAGOZA, 2013). Um exemplo são as aspergiloses, adquiridas por meio de transmissão aérea (FLEISCHER et al., 2006; TONG et al., 2017).

Atuando de maneira oportunista, há inúmeros relatos acerca de pacientes hospitalizados acometidos por micoses causadas por fungos filamentosos aerotransportados presentes no ambiente. Porém, no Brasil, poucos estudos caracterizam as microbiotas deles nas UTIs. Conhecer a prevalência dos fungos com potencial patogênico, presentes na atmosfera destas unidades hospitalares, permite a promoção de estratégias de prevenção de infecções nosocomiais. (CORDEIRO et al., 2021; GONÇALVES et al., 2018; LOBATO; VARGAS; SILVEIRA, 2009). Infecções hospitalares causadas por fungos anemófilos têm sido relatadas com frequência, tornando cada vez mais importante o conhecimento da qualidade do ar (DO NASCIMENTO et al., 2019; GONÇALVES et al., 2018; SMITH et al., 2018).

As Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são setores onde os índices de infecção hospitalar são mais elevados e isso é resultado da interação entre microrganismos, o meio ambiente e a deficiência dos fatores de defesa dos pacientes. O risco aumentado de infecção em pacientes críticos de UTI pode ser explicado pela presença de modificações no sistema imune destes pacientes (CALUMBY et al., 2019; TROF et al., 2007). Outros fatores importantes a se considerar são o comprometimento de barreiras anatômicas por procedimentos invasivos e o uso

prolongado de antibióticos, que permitem a eliminação da microbiota bacteriana competidora (KAMIMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013).

Os fungos são subestimados como causadores de doenças em humanos. Procedimentos cirúrgicos complexos, perda de integridade de barreiras naturais, inúmeros procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana prolongada são fatores que contribuem para o preocupante aumento dessas infecções, principalmente aquelas em Unidades de Terapia Intensiva (BROWN et al., 2012; PEMÁN; ZARAGOZA, 2013).

Silenciosamente, os fungos se disseminaram e aumentaram seu poder agressivo, concorrendo com infecções graves e, em alguns casos, mostrando-se resistentes aos antifúngicos convencionais (OHNISHI et al., 2022; PAULA et al., 2021). Pesquisas costumam focar em doenças específicas, como a AIDS e a malária, entretanto, existem poucos dados que demonstram o real impacto da infecção fúngica, o que tem sido reconhecido como uma barreira à tomada de decisões em saúde pública pelas autoridades globais, uma vez que costumam ser subdiagnosticadas (BONGOMIN et al., 2017; RICHARDSON, 2018).

A dificuldade em se obter dados epidemiológicos a respeito de infecções causadas por fungos anemófilos em ambientes hospitalares encontra-se, principalmente, em dois fatores: nas dificuldades no diagnóstico e no período prolongado de incubação destes microrganismos. Frequentes admissões e altas dificultam a determinação da exposição de ter ocorrido no ambiente hospitalar ou na comunidade (ALANGADEN, 2011; BROWN et al., 2012).

1.2 Fatores que influenciam na concentração e diversidade de fungos no ar

Estudos anteriores mostraram que fatores ambientais como temperatura, umidade, velocidade do vento, pressão atmosférica, substratos orgânicos disponíveis, condições climáticas e variação sazonal podem afetar a diversidade de fungos transportados pelo ar em diferentes ambientes (ADHIKARI et al., 2004; TANG; KUEHN; SIMCIK, 2015)

Os fungos são transportados pelo ar durante quase o ano todo, mas o ritmo sazonal na ocorrência de esporos transportados pelo ar e seu espectro dependem do tipo de clima (BRENIER-PINCHART et al., 2009; KASPRZYK, 2008).

Nageen et al. (2021) descreveram que, dos fatores por eles avaliados em ambientes externos, o vento teve a maior influência na comunidade fúngica, melhorando a liberação e dispersão de esporos fúngicos, favorecendo a remoção de esporos de corpos frutíferos e seu transporte e suspensão no ar (NAGEEN et al., 2021; TANG; KUEHN; SIMCIK, 2015).

Estes fatores externos podem ser responsáveis pela concentração de fungos filamentosos em ambientes internos e em unidades hospitalares. Temperaturas acima de 25°C, alta pluviosidade, baixa velocidade do vento e alta concentração de fungos no ambiente externo favorecem o aumento de conídios e/ou esporos no ambiente interno, enquanto que chuvas e ventos muito fortes estão relacionados a menores concentrações de fungos no ambiente interno (BRENIER-PINCHART et al., 2009).

O método construtivo utilizado nos ambientes internos como madeira, celulose, papel de parede, materiais orgânicos de isolamento, têxteis, colas e tintas podem conter nutrientes como carboidratos e proteínas que servem muito bem ao crescimento de fungos. Concreto, metais, fibras de vidro, plásticos e outros produtos sintéticos, embora não sejam facilmente utilizados por fungos, podem conter restos orgânicos que servem como fonte de nutrientes (BAUGHMAN; ARENS, 1996). Em geral, os valores de temperatura e umidade para o crescimento de fungos em ambientes internos podem variar dependendo da espécie considerada, visto que geralmente apresentam valores de temperatura ótimos para o crescimento de fungos, variando de 10 a 35°C (DO NASCIMENTO et al., 2019).

1.3 *Cladosporium* spp.

Dentre os fungos anemófilos contaminantes, destacam-se os do gênero *Cladosporium* spp., conhecidos como fungos negros ou escuros. O gênero *Cladosporium* spp. é composto por fungos contaminantes e oportunistas demáceos, considerados saprófitas por serem encontrados no solo e em materiais em decomposição, como restos vegetais. Eles possuem crescimento lento, necessitando de um ambiente com baixas temperaturas e alta umidade para crescerem de forma vigorosa. São fungos caracterizados por produzirem colônias com textura aveludada e plana, que possuem tonalidades que variam do verde oliva ao marrom enegrecido (RÄUT et al., 2021; ZIMOWSKA et al., 2021).

São microrganismos cosmopolitas amplamente encontrados na natureza isolados, principalmente em regiões de clima temperado. Além do *Aspergillus* e

Penicillium, o *Cladosporium* é considerado um dos gêneros mais comuns encontrados em ambientes fechados, com algumas espécies predominando em condições ambientais. (BENSCH et al., 2018; ROSADO et al., 2019). O gênero *Cladosporium* envolve fungos com ampla distribuição mundial e suas espécies estão entre as mais abundantes em ar externo e interno. Conídios de espécies deste gênero são comumente isolados do ar. Embora a maior prevalência de *Cladosporium* seja verificada no ar atmosférico, seu isolamento em ambientes de ar interno também foi notado em materiais comuns como tintas, madeira, tecidos e outros compostos orgânicos. (DO NASCIMENTO et al., 2019; ZOPPAS; VALENCIA-BARRERA; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, 2011).

O *Cladosporium* spp., tem como propriedade digerir proteínas da epiderme, causando lesões de pele que podem abrir caminhos para que esse fungo se dissemine. Isso leva ao comprometimento parcial ou total de alguns órgãos (MENEZES; PÉREZ; LIMA, 2017), visto que há relatos em casos de meningite, infecções subcutâneas e intra-brônquicas (BANERJEE et al., 2002; BATRA et al., 2019). Além disso, Batra et al. (2019) relataram um caso de abscesso cerebral por uma espécie deste gênero.

1.4 Leveduras *killer* e o Sistema *killer*

Inicialmente descrito por Bevan e Makower (1963), leveduras *killer* são aquelas capazes de promover atividade letal sobre leveduras susceptíveis. O fenótipo *killer* foi descoberto a partir das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Foram diferenciados os três fenótipos: *killer*, sensível e neutro, sendo a levedura *killer* capaz de produzir toxinas que causam a morte de leveduras sensíveis, e a levedura neutra não produtora de toxina, ou seja, não afetada pela toxina. (SCHMITT; BREINIG, 2002).

O fenômeno *killer* de leveduras é proveniente da ação fulminante de micocinas, proteínas ou glicoproteínas tóxicas de baixo peso molecular, consideradas metabólitos secundários secretados por cepas, as quais são imunes a sua própria toxina, capazes de inibir outras leveduras sem a necessidade de contato direto célula-célula (CAPPELLI et al., 2014; CECARINI et al., 2019; FUENTEFRIA et al., 2006).

A competição por espaço, nutrientes e outros recursos no ambiente é um mecanismo comum através do qual diferentes espécies de microrganismos podem interagir ou competir por sobrevivência (GIOVATI et al., 2021). No habitat natural,

podem ser encontradas em porcentagens que excedem várias vezes aqueles encontrados em linhagens de laboratório, indicando a existência de uma vantagem competitiva para as cepas que utilizam estes compostos letais como estratégia para eliminar concorrentes na busca por nutrientes (BELDA et al., 2017; ROBLEDO-LEAL; VILLARREAL-TREVIÑO; GONZÁLEZ, 2012). Entretanto, seu papel ainda não está elucidado por completo (FREDLUND et al., 2002).

Estas micocinas possuem uma grande biodiversidade quanto as suas características bioquímicas, genéticas e de modo de ação (MAGLIANI et al., 1997). A expressão das micocinas pode sofrer alterações a depender de variáveis como: temperatura, pH, composição química do meio e concentração celular. Normalmente, a atividade ótima das micocinas ocorre em pH 4,5 a 25 °C, entretanto esses valores tendem a se diferenciar para atender condições específicas de cada gênero, espécie ou linhagens de leveduras produtoras de micocinas (BUZZINI; TURCHETTI; VAUGHAN-MARTINI, 2007; FUENTEFRIA et al., 2006; MAGLIANI et al., 1997).

O mecanismo de ação, que ainda precisa ser esclarecido para várias das leveduras *killers*, é variável e inclui danos na parede celular ou membrana, bem como a interrupção do ciclo celular (GIOVATI et al., 2021).

Como antimicrobianos naturais, as leveduras *killers* têm sido exploradas para possíveis aplicações na produção e conservação de alimentos e no controle biológico de patógenos de plantas, animais e humanos (MANNAZZU et al., 2019).

1.5 *Wickerhamomyces anomalus* e micocinas

Nas últimas duas décadas, houve renomeação das leveduras, incluindo as cepas do tipo *killer*, em novos gêneros e espécies. Com base no aprimoramento no sequenciamento de DNA e na análise filogenética de sequências de genes, espécies do gênero *Hansenula* foram reatribuídos ao gênero *Pichia* e depois ao gênero *Wickerhamomyces* (CAPPELLI; FAVIA; RICCI, 2021; GIOVATI et al., 2021).

Wickerhamomyces anomalus, é uma levedura pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae*. Algumas cepas desta levedura possuem ação antimicrobiana, pois são capazes de produzir micocinas caracterizadas por um amplo espectro de atividade, compreendendo patógenos relevantes de plantas, animais e humanos (CAPPELLI et al., 2014; CUNHA et al., 2020; FREDLUND et al., 2002; GIOVATI et al., 2021;

KURTZMAN, 2011; KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008; VALZANO et al., 2016; WALKER, 2011; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

Wickerhamomyces anomalus foi a primeira levedura produtora de micocinas (também denominada de levedura *killer*) descoberta a ser capaz de inibir o crescimento, tanto de organismos eucariotos, quanto de procariotos patogênicos (POLONELLI et al., 1986, 2011).

Embora *Wickerhamomyces anomalus* já tenha sido relatada como causadora de infecções nosocomiais, ela acomete principalmente imunossuprimidos e é considerada uma levedura de baixa virulência, uma vez que foram notificados raros casos no mundo (DANIEL et al., 2011). Testes de segurança mostraram *Wickerhamomyces anomalus* pouco prejudicial a células de mamíferos, sugerindo não serem sensíveis à atividade assassina da levedura (CAPPELLI et al., 2019). Segundo a European Food Safety Authority (EFSA) (2007), a *Wickerhamomyces anomalus* é definida como um microrganismo seguro para indivíduos saudáveis, recebendo o status de Qualified Presumption of Safety (QPS) e classificado em nível 1 em biossegurança (KURTZMAN, 2011; SUNDH; MELIN, 2011).

Wickerhamomyces anomalus é caracterizada por não possuir exigências nutricionais complexas e resistir a ambientes hostis por longos períodos, sendo altamente competitiva. Além disso, pode ser encontrada em habitats amplamente diversificados, como em plantas, ambientes marinhos, cascas de frutas, sendo também descrito seu isolamento em intestinos de insetos (HUA et al., 2015; WALKER, 2011).

Atribui-se esta característica ao fato de que a levedura é adaptável a condições extremas de estresse ambiental, possibilitando o seu desenvolvimento em diferentes fontes com carbono, nitrogênio e fósforo, em variações de pH, baixa atividade de água e oxigênio e alta pressão osmótica (WALKER, 2011).

A capacidade de inibir microrganismos prejudiciais em uma variedade de habitats, amplo espectro de atividade antimicrobiana e grande estabilidade levaram o uso de *Wickerhamomyces anomalus* como um agente de biocontrole, uma vez que poderia ser classificado como um microrganismo de baixo risco, raramente rastreado em amostras humanas. Além disso, já é comprovada *in vitro* a atividade de *Wickerhamomyces anomalus* contra dermatófitos e leveduras patogênicas (GIOVATI et al., 2018). Com isso, a *Wickerhamomyces anomalus* possui aplicabilidade em processos da indústria alimentícia e biocontrole nas áreas agrícola e clínica (MAGLIANI et al., 1997; PASSOTH et al., 2006; WALKER, 2011).

O potencial antimicrobiano de leveduras foi descoberto por Hayduck (1909), enquanto a descoberta das micocinas ocorreu em 1963, por Bevan e Makover. Após a descoberta das micocinas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae*, outras leveduras passaram a ser estudadas e identificadas com o mesmo potencial, como também vê-se nos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodothorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Ustilago* e *Zigowilliopsis* (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Alguns mecanismos são apresentados para justificar a ação das micocinas sobre outros microrganismos, sendo eles: alteração da permeabilidade da membrana, inibição da replicação do DNA e a inibição da síntese de parede por β -1,3-glucano sintetase e hidrólise β -1,3-glucano. Porém muitos mecanismos permanecem desconhecidos e ainda necessitam de mais estudos (STEWART, 2017). A levedura em questão, *Wickerhamomyces anomalus*, é capaz de produzir diferentes grupos de micocinas com massas moleculares distintas. Ensaio de atividade antimicrobiana confirmam a capacidade desta levedura *killer* de agir nas glucanas da parede celular (CECARINI et al., 2019). O mecanismo de ação ainda não plenamente elucidado descreve atividade sobre a parede celular de leveduras, degradando β -glucanos através da ação de β -1,3-glucanase (GIOVATI et al., 2018).

O glucano é um importante polímero presente em bactérias e, em abundância, em células fúngicas. As micocinas do tipo glucanases atuam na hidrólise de β -1,3-glucano ou β -1,6-glucano, cujo fenômeno provoca a perda dos componentes citoplasmáticos e, conseqüentemente, a morte celular. Como as células de mamíferos não possuem este constituinte na membrana, o mecanismo *killer* torna-se seletivo para microrganismos. Deste modo, considera-se que este tipo de micocinas são minimamente tóxicas e de baixa probabilidade de indução a resistência (IZGU; KEPEKCI; IZGU, 2011; IZGÜ; ALTINBAY; TÜRELI, 2007; MIURA et al., 2003; MUCCILLI et al., 2013; PARIS et al., 2016; POLONELLI et al., 1983).

Até o momento, o fenômeno *killer* já foi descrito por quase cem espécies de mais de vinte gêneros. Outros estudos demonstraram a ação das micocinas produzidas por diferentes espécies leveduriformes diante de várias cepas de bactérias dentre elas: *Salmonella typhimurium in vitro* (FRANÇA et al., 2015), *Escherichia coli* em camundongos (CHEN et al., 2015), *Staphylococcus aureus* (CALAZANS et al., 2021), *Acinetobacter baumannii* (JUNGES et al., 2020), *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (BAJAJ;

RAINA; SINGH, 2013), *Listeria monocytogenes* (CEUGNIEZ et al., 2015) e de leveduras *Candida albicans* (CEUGNIEZ et al., 2015; PARIS et al., 2016; WEILER; SCHMITT, 2003) *Candida glabrata*, *Candida krusei* (WEILER; SCHMITT, 2003).

Tendo em vista o crescimento de patógenos resistentes, faz-se necessário o estudo para descoberta e desenvolvimento de alternativas antimicrobianas. Isso ocorre a partir de substâncias minimamente agressivas, de baixa toxicidade ao organismo humano e que apresentem níveis ideais de segurança (PARIS et al., 2016; YU et al., 2021).

Os antibióticos disponíveis atualmente podem ter efeitos críticos como fotossensibilidade, ototoxicidade, condrotoxicidade, retinopatia e neuropatias no organismo do paciente. Ainda, algumas evidências mostram que a exposição contínua aos antibióticos ocasionam efeitos negativos na homeostase intestinal e na barreira epitelial da pele (YU et al., 2021). Visto que a citotoxicidade das células de mamíferos a agentes antimicrobianos é uma das limitações para a sua aplicação (SONG et al., 2017), é importante avaliar a potencial toxicidade das micocinas. As micocinas são classificadas como tendo nula ou quase nula toxicidade em células humanas. Paris et al. (2016) avaliaram a toxicidade das micocinas produzidas por *W. anomalus* em eritrócitos humanos, concluindo que as micocinas não foram tóxicas para as células testadas, apresentando hemólise de apenas 5,2%, constatando também que os efeitos tóxicos das micocinas foram mínimos quando comparados aos efeitos da Anfotericina B. Esses resultados foram corroborados por Junges et al. (2020), os quais evidenciaram a baixa toxicidade em teste de hemólise em ensaio com *Artemia Salina*, constatando mais uma vez que as micocinas produzidas por *W. anomalus* não são tóxicas, visto que não apresentaram toxicidade nos microcrustáceos. Assim, as micocinas são consideradas substâncias naturais de baixa toxicidade em células humanas, sendo fortes candidatas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos com grande potencial de aplicação e interesse para a indústria farmacêutica (JUNGES et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2020; PARIS et al., 2016).

Considerando o risco potencial da exposição de pacientes em cuidados intensivos à fungos oportunistas presentes no ambiente, faz-se necessário o monitoramento periódico para conhecimento da microbiota anemófila em UTIs Neonatais. Além disso, tendo em vista a resistência microbiana em produtos já existentes, este trabalho busca analisar a ação de micocinas como alternativa para redução/controlar de fungos anemófilos dos ambientes.

2. OBJETIVOS

Avaliar a inibição de fungos anemófilos coletados nas 4 estações do ano em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal por micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*.

2.1 Objetivos específicos

- Isolar fungos anemófilos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário do Oeste do Paraná através de monitoramento;
- Obter as micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* WA40;
- Dosar a quantidade de β -glucanases no sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalus* WA40;
- Verificar inibição de fungos anemófilos em meio sólido contendo micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*.
- Testar cepas do gênero *Cladosporium* spp. frente ao sobrenadante contendo as micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 pelo método de macrodiluição em meio líquido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Monitoramento dos fungos anemófilos

3.1.1 Local e período da amostragem

Foi realizado um estudo transversal no período de setembro de 2021 a agosto de 2022 na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP). O Hospital em questão possui 10 leitos na UTI Neonatal e está localizado no município de Cascavel, Paraná, ofertando a população da região serviços de alta complexidade nas áreas de gestação de alto risco, traumatologia, cirurgia vascular e neurologia. Ele é vinculado à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE para fins de ensino, pesquisa e extensão, sendo os atendimentos feitos, em sua totalidade, pelo Sistema Único de Saúde - SUS.

3.1.2 Coleta, isolamento e identificação

A metodologia empregada para coleta baseou-se na técnica de sedimentação passiva, a partir da exposição de placas de Petri (90mm) contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) para deposição de esporos, conídios e outras estruturas fúngicas presentes no ar atmosférico. As placas foram expostas semanalmente durante 15 minutos no período da manhã, a uma altura de 1 metro do chão e distantes das paredes, simulando o posicionamento das incubadoras e berços presentes na unidade. Em seguida, foram incubadas por 10 dias a 25°C. As colônias presentes foram repicadas em tubos contendo ASD para seu isolamento e incubadas por até 10 dias. Para identificação dos fungos, foram observados os aspectos macroscópicos das colônias, além do aspecto microscópico a partir da estimulação da esporulação pela técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula coradas por Lactofenol.

3.2 Teste para Inibição de Fungos Anemófilos

3.2.1 *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura utilizada foi molecularmente identificada como *Wickerhamomyces anomalus* WA40 e sua respectiva sequência está depositada no GenBank (KT580792 disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT580792>), sendo anteriormente

coletada às margens do Lago de Itaipu, localizado no estado do Paraná, Brasil e tendo passado por testes de triagem para verificação de produção de micocinas. Atualmente faz parte da micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE), sendo armazenada de três formas: em geladeira, em temperatura ambiente e congelada. Previamente à produção das micocinas, as cepas foram devidamente reativadas 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°C e incubadas a 32°C durante 48 horas.

3.2.2 Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

A produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 foi realizada de acordo com Paris et al. (2016), na qual as cepas da levedura, previamente reativadas em ágar Sabouraud modificado, foram inoculadas 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 incubados a 25°C por 5 dias. Após este período, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 min, obtendo o sobrenadante que, na sequência, foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4°C.

3.2.3 Determinação da atividade de β-glucanases

A determinação de β-glucanases presentes no filtrado do sobrenadante de cultura de *W. anomalus* WA40 contendo as micocinas foi realizada de acordo com Miller (1959) com algumas adaptações, utilizando laminarina 1% (obtida a partir da *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 de cultura de *W. anomalus* WA40 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) a fim de parar a reação. Para o branco foi utilizada 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 foi realizada a 550 nm pelo espectrofotômetro. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol 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 (1976). Para a preparação da reação, misturou-se 1 mL do Reagente Bradford com 100 μ L do sobrenadante contendo micocinas de *W. anomalus*. Deixou-se a mistura em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, leu-se em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração total de proteínas foi expressa em mg/mL. A atividade específica de β -glucanases foi calculada dividindo a concentração da atividade enzimática pela concentração das proteínas e os valores foram reportados em U/mg. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.4 Teste de inibição em meio sólido

Paralelo ao monitoramento realizado pela técnica de sedimentação passiva, foi também observada a inibição dos fungos anemófilos em meio sólido contendo micocinas produzidas por *W. anomalus*.

Foram preparados meios testes a partir de Ágar Sabouraud Dextrose com sobrenadante de micocinas de *W. anomalus* contendo 3,4 U/mg de β -glucanases.

Os meios foram vertidos em placas de Petri e expostos por 15 minutos a uma altura de 1 metro do chão na UTI Neonatal do HUOP.

Na sequência, foram mantidos em temperatura ambiente durante 5 a 10 dias.

3.2.5 Atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição

Para o teste de macrodiluição, utilizou-se o método M38-A Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para fungo filamentoso com algumas adaptações. O fungo testado foi o mais incidente na UTI Neonatal no período estudado – *Cladosporium* spp. O fungo filamentoso foi cultivado em ASD em temperatura ambiente durante 7 dias. O inóculo foi preparado adicionando-se 10mL de solução NaCl 0,9% com 1 gota de Tween 20. A solução resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de fundo cônico estéril; aguardou-se 10 minutos para a sedimentação de partículas e a suspensão homogênea superior foi ajustada para uma densidade óptica de 0,069-0,11 (transmitância de 80-82%) a 625nm. Os inóculos de microrganismos padrão foram ajustados à concentração de 10^3 UFC/mL,

as soluções foram homogeneizadas em 10 mL de caldo Mueller Hinton (MH) e distribuídas (500 μ L) em tubos.

O sobrenadante contendo as micocinas foi diluído em água destilada estéril e adicionado aos tubos (500 μ L), resultando nas seguintes concentrações de β -glucanase: 0,13; 0,26; 0,52; 1,05; 2,1 e 4,2 U/mg. As leituras foram realizadas em 48 horas, de modo que a última diluição, na qual havia inibição do crescimento microbiano, foi tomada como resultado em comparação com os controles positivo e negativo. Alíquotas de 10 μ L foram extraídas dos tubos-resultado e semeadas em placas contendo ASD para confirmar a completa inibição. O teste foi realizado em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Monitoramento de fungos anemófilos na UTI Neonatal

Sabe-se que a atmosfera interna dos hospitais não é isenta de partículas aerobiológicas (MOLINA et al., 2002). Dessa forma, os resultados deste estudo demonstram claramente que o ambiente hospitalar é, sem dúvida, uma fonte de microrganismos fúngicos capazes de promover reações alérgicas e sensibilização de indivíduos atópicos, bem como possíveis infecções fúngicas das mais diversas etiologias, corroborando os estudos de microbiota anemófila feitos por diferentes autores (FLEISCHER et al., 2006; GONÇALVES et al., 2018; LOBATO; VARGAS; SILVEIRA, 2009; MENEZES et al., 2004; MEZZARI et al., 2003).

Fungos potencialmente patogênicos foram isolados no ambiente e período estudados. Das 52 coletas no ambiente da UTI Neonatal, 43 apresentaram crescimento de UFCs fúngicas, com 213 UFCs no total e 15 gêneros identificados – *Aureobasidium* spp., *Curvularia* spp., *Emmonsia* spp., *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Scedosporium* spp., *Chrysosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. Destes, 14 fungos filamentosos e 1 gênero de levedura – *Rhodotorula* spp. O gênero fúngico com maior incidência no período, com 40% do total de UFCs isolados, correspondeu ao gênero *Cladosporium* spp. (86 UFC), seguido por *Penicillium* spp., com 21% (44 UFC). Os gêneros *Geotrichum* spp., *Emmonsia* spp. e *Curvularia* spp. apresentaram incidência de 0,5% em UFCs isoladas, representadas por apenas 1 UFC cada, identificadas apenas na estação da primavera (Figura 1).

A contaminação fúngica no ar em UTI Neonatal tem sido um tema pouco abordado em estudos no Brasil, mas é de grande importância devido ao aparecimento de agentes fúngicos em infecções hospitalares (MALDONADO-VEGA et al., 2014; RECHIA, 2010). Borba et al. (2021) verificaram a presença de fungos no ar e contaminantes da incubadora em uma UTI Neonatal e encontraram *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Candida* spp. e *Nigrospora* spp. Com relação ao ambiente hospitalar, Molina et al. (2002) e Lobato et al. (2009), ao estudarem ambientes hospitalares e de dispersão fúngica, conseguiram perceber que eventos de desinfecção, ventilação e trânsito de pessoal são fatores determinantes para a

presença de fungos anemófilos, e em seus estudos verificaram a prevalência do gênero *Cladosporium* spp.

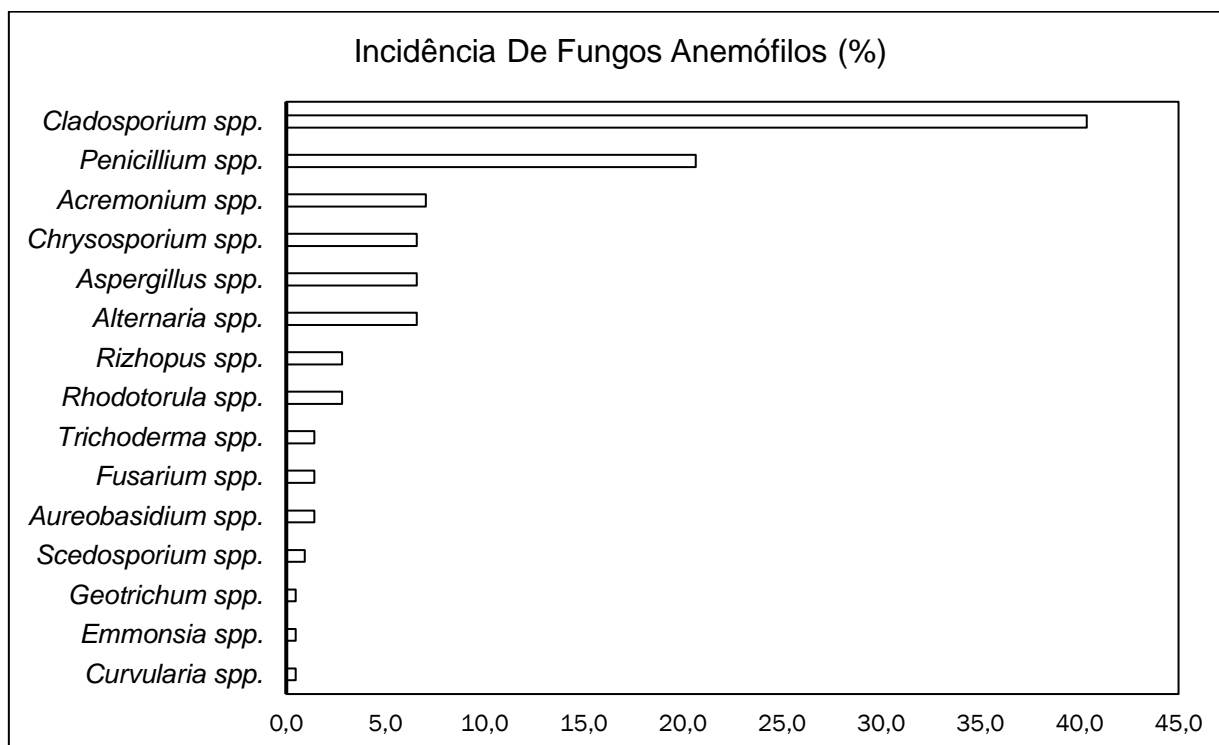


Figura 1 Incidência de fungos anemófilos identificados representados em porcentagem.

O *Cladosporium* spp., fungo demáceo, contém melanina em suas paredes celulares, o que lhes confere uma coloração escura em seus esporos e hifas, mais frequentemente associada à virulência do microrganismo (HOFFMANN et al., 2011). Embora a maior prevalência de *Cladosporium* spp. seja verificada no ar atmosférico, também foi verificado seu isolamento em ambientes de ar interno, e sua ocorrência como uma das mais prevalentes em ambientes hospitalares (GONÇALVES et al., 2018; MARTINS-DINIZ et al., 2005; ZOPPAS; VALENCIA-BARRERA; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, 2011). Ainda que as espécies de *Cladosporium* sejam raros patógenos humanos, elas estão envolvidas em infecções de pele, feohifomicoses e infecções pulmonares (DO NASCIMENTO et al., 2019), algumas delas apresentando piora significativa, o que pode representar um risco enorme para os pacientes hospitalizados. Estudos adicionais também observaram a presença de *Cladosporium* spp. como um dos principais poluentes atmosféricos em ambientes hospitalares (LOBATO; VARGAS; SILVEIRA, 2009; MALDONADO-VEGA et al., 2014).

A estação com maior quantidade de UFCs isoladas foi o outono (73 UFC), com predominância de *Penicillium* spp. (42% - 31 UFC). O verão foi a estação com menor número de gêneros identificados: *Alternaria* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., e *Cladosporium* spp., com *Cladosporium* spp. o mais incidente,

20 UFC (65%). Na primavera, 12 gêneros diferentes foram identificados, sendo a estação com a maior variedade fúngica, tendo *Cladosporium* spp como a mais incidente, seguida de *Penicillium* spp., 9 UFC (18%) (Tabela 1).

Tabela 1 Incidência de fungos anemófilos por estação do ano.

Gêneros Identificados	Distribuição Incidência por Estação do Ano							
	Inverno		Outono		Primavera		Verão	
	UFC	%	UFC	%	UFC	%	UFC	%
<i>Acremonium</i> spp.	5	8	7	10	3	6	-	-
<i>Alternaria</i> spp.	7	12	1	1	4	8	2	6
<i>Aspergillus</i> spp.	-	-	9	12	-	-	5	16
<i>Aureobasidium</i> spp.	2	3	-	-	1	2	-	-
<i>Chrysosporium</i> spp.	10	17	2	3	2	4	-	-
<i>Cladosporium</i> spp.	30	51	15	21	21	42	20	65
<i>Curvularia</i> spp.	-	-	-	--	1	2	-	-
<i>Emmonsia</i> spp.	-	-	-	-	1	2	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	1	1	2	4	-	-
<i>Geotrichum</i> spp.	-	-	-	-	1	2	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	-	-	31	42	9	18	4	13
<i>Rhodotorula</i> spp.	-	-	6	8	-	-	-	-
<i>Rizhopus</i> spp.	5	8	1	1	-	-	-	-
<i>Scedosporium</i> spp.	-	-	-	-	2	4	-	-
<i>Trichoderma</i> spp.	-	-	-	-	3	6	-	-
Total	59	100	73	100	50	100	31	100

Como consequência da relação que os processos aerobiológicos mantêm com a atmosfera, os fatores meteorológicos influenciaram significativamente o comportamento das partículas biológicas aéreas. (ZOPPAS; VALENCIA-BARRERA; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, 2011). No estudo de Silva et al. (2017), a estação da primavera apresentou maior variedade e concentração de fungos (SILVA et al., 2017), ao contrário do que foi descrito por Menezes et al. (2004), que relatou que a temporada de verão foi a que apresentou o maior número de gêneros isolados (MENEZES et al., 2004). Essa diferença está relacionada aos aspectos climáticos de cada região, bem como à metodologia empregada para o isolamento dos microrganismos em cada estudo (BRENIER-PINCHART et al., 2009).

Outros estudos trazem a sazonalidade como principal influência no número de esporos e conídios de fungos em suspensão ou os gêneros/espécies de fungos predominantes (GNIADÉK et al., 2010; MACEDO et al., 2013; MARTINS-DINIZ et al., 2005; PARK et al., 2013; QUADROS et al., 2009; SALES et al., 2011). Sales et al.

(2011) isolaram o maior número de fungos na estação do inverno, enquanto Boff et al. (2013) relataram uma concentração fúngica significativamente maior no outono em comparação com o verão e a primavera.

Neste estudo, foram realizados testes preliminares para avaliar a variação entre turnos (manhã e tarde), e foi notado que não houve variação (dados não mostrados). Gniadek et al. (2010) relataram que o número de fungos nas amostras da manhã superou o das amostras noturnas, com contagens médias que variaram de 50 a 2370 UFC/m³. Esses achados assemelharam-se ao achado de Macedo et al. (2013), que também verificaram que os fungos prevaleceram no período da manhã. Eles atribuíram esse achado à limpeza diária, que ocorria nesse período e causava maior número de partículas suspensas no ar. Em contraste, Martins-Diniz et al. (2005) descrevem que o período propenso a maior quantidade de esporos fúngicos no ar foi a tarde, devido ao maior número de indivíduos circulando nestes horários. Quadros et al. (2009) descreveram resultados semelhantes, os quais indicaram que a concentração fúngica no ar interno das UTIs foi maior no período da tarde (86–62 UFC/m³ comparado à manhã - 191–351 UFC/m³).

Park et al. (2013), que analisaram o ar interno de seis hospitais na Coreia, apresentaram maior concentração de esporos de fungos no ar a partir das 16h com pico às 17h. No entanto, em média, não houve diferença estatisticamente significativa entre o verão e o outono. Outros fatores como temperatura do ar, umidade e o número de pessoas circulantes também influenciam no nível de fungos (PARK et al., 2013). No entanto, Qudiesat et al. (2009), Macedo et al. (2013), El-Sharkawy e Noweir (2014), e Souza et al. (2019) apontaram que, dentre todos os fatores, a presença humana contribuiu significativamente para a diversidade fúngica observada no ar interno dos hospitais. No caso particular da UTI Neonatal, a presença das mães e do corpo clínico contribui para esse aumento (MACEDO et al., 2013).

4.2 Inibição de fungos anemófilos por micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

4.2.1 Determinação da atividade de β -glucanases

A parede celular dos microrganismos é constituída por polissacarídeos, como os β -glucanos. As β -glucanases podem ativar um sistema de lise celular e atuar hidrolisando e degradando as glucanas, incluindo β -1,3;1,6-glucanos, presentes na

parede celular de alguns microrganismos (BIEIECKI; GALAS, 1991; ROSSETO et al., 2022). Um estudo de Tay et al. (2014) confirmou a presença de β -glucanases em micocinas produzidas por *W. anomalus*, por isso a determinação da sua atividade implica em sua capacidade de destruir células de microrganismos patogênicos.

Neste estudo, a atividade específica de β -glucanases obtida a partir da cultura de *W. anomalus* WA40 foi de 4,2 U/mg. Rosseto et al. (2022) obtiveram, com o mesmo estudo, a quantidade de 2,47 U/mg. Já Calazans et al. (2021), relataram 0,40 U/mg de atividade específica em micocinas produzidas por *W. anomalus*. A disparidade na produção de β -glucanases pode estar relacionada a cepa e otimização de cultivo, bem como as condições de cultivo, pH, temperatura, densidade do inóculo e tempo de incubação.

4.2.2 Atividade antimicrobiana em meio sólido

O teste do meio sólido foi realizado para avaliar a atividade antifúngica das micocinas produzidas por *W. anomalus*.

A placa controle e a placa teste foram submetidas à exposição em tempos iguais. Na Figura 2, pode-se observar na placa controle o crescimento dos fungos ali sedimentados (lado A); na placa teste (lado B), houve a adição do sobrenadante contendo micocinas de WA40 (concentração de 3,4 U/mg de β -glucanases) no meio de cultura, verificando, dessa forma, a inibição total de fungos anemófilos.

A realização do teste de atividade antimicrobiana em meio sólido é um método bastante efetivo, pois oferece uma leitura visual da ação das micocinas sobre o microrganismo testado. Isso foi demonstrado no trabalho de Junges et al. (2020), que verificaram a inibição total de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* isoladas de amostras biológicas humanas, e na pesquisa de Calazans et al. (2021), em que pode ser vista a inibição de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de carnes. Ambos os resultados ocorreram devido à presença de micocinas de *W. anomalus* no meio de cultura. Neste estudo, as cepas testadas apresentaram inibição no crescimento quando inoculadas no meio de cultura contendo 3,4 U/mg de β -glucanases.

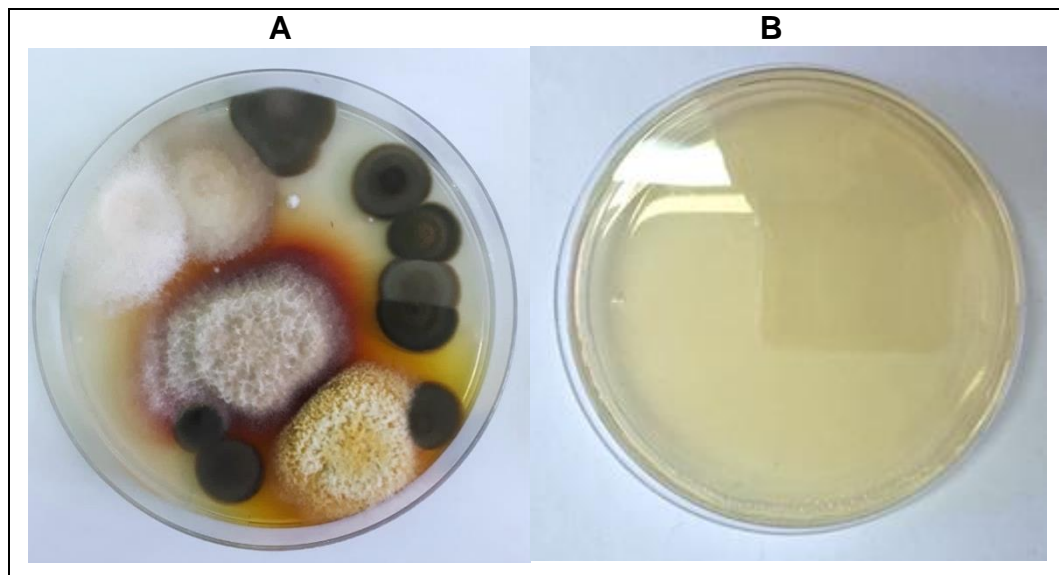


Figura 2 Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. (A) Meio de cultura Ágar Sabouraud. (B) Meio de cultura acrescido de 3,4 U/mg de β -glucanases obtidas a partir de *W. anomalous* WA 40 sem crescimento fúngico.

4.2.3 Atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição em caldo

O teste de macrodiluição foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima de β -glucanases presentes no sobrenadante de *W. anomalous* WA40, capaz de impedir o crescimento de cepas de *Cladosporium* spp. A Figura 3 demonstra a inibição quando usada a concentração de 4,2 U/mg de β -glucanases. Para realizar a leitura foi observada a turvação do caldo de modo que a última diluição, na qual houve inibição do crescimento microbiano, foi tomada como resultado.

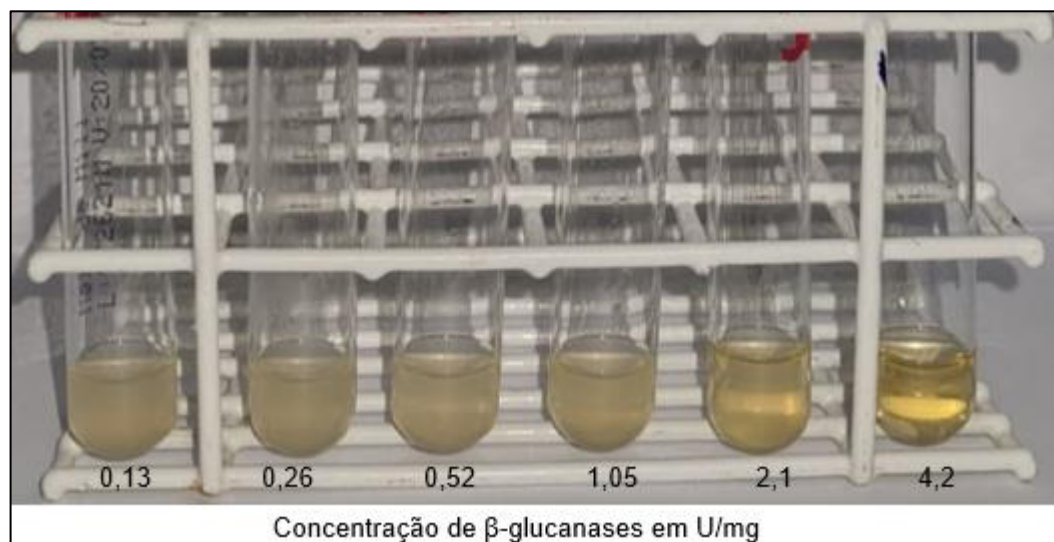


Figura 3 Leitura do teste de macrodiluição mostrando a turvação fúngica nas concentrações de β -glucanases nas quais ocorreram o crescimento de cepas de *Cladosporium* spp.

Os resultados mostraram que as micocinas presentes no sobrenadante de WA40 na concentração 4,2 U/mg de β -glucanases foram capazes de inibir em 100% (40/40) das cepas de *Cladosporium* spp. testadas. Ao utilizar a concentração 2,1 U/mg, 35% (14/40) das cepas apresentaram sensibilidade; já na concentração 1,05 U/mg, apenas 5% (2/40) das cepas foram suscetíveis ao sobrenadante de *W. anomalus* WA 40. Nas demais concentrações, não houve inibição das cepas.

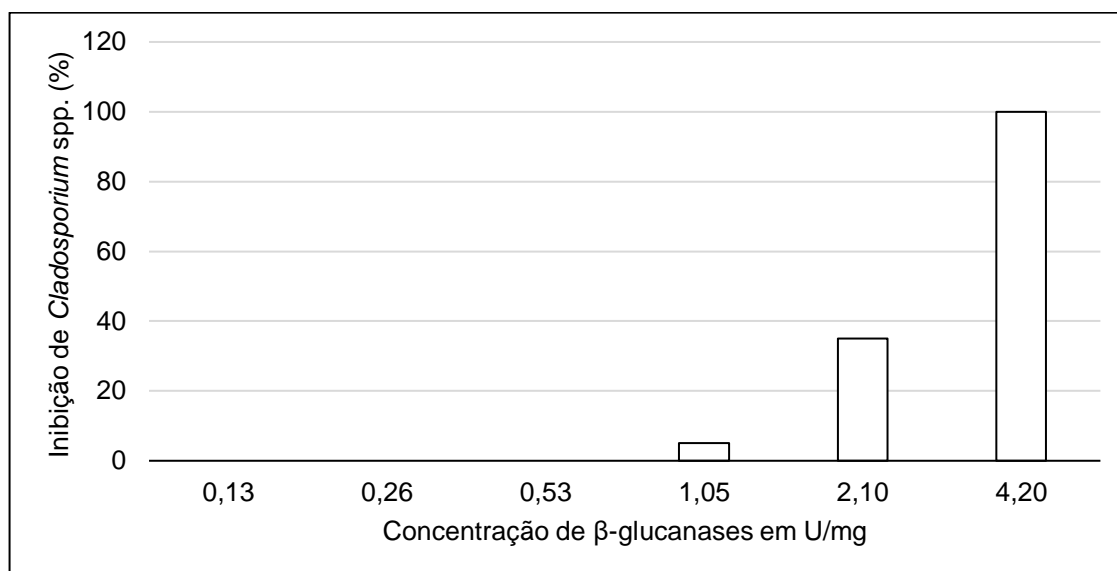


Figura 4 Teste de susceptibilidade de *Cladosporium* spp. frente às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* presentes no sobrenadante de WA40 em diferentes concentrações de β -glucanases.

Menezes et al. (2022) consideraram o teste de diluição em caldo como de baixo custo e fácil execução. Isso se deu ao testarem a susceptibilidade de *Cladosporium sphaerospermum* Penz frente ao Citral. Paris et al. (2016), que relataram que as micocinas apresentaram atividade antimicrobiana, por meio do teste em microdiluição em caldo, quando testadas sobre leveduras de *Candida albicans*. Neste estudo, por meio do teste de macrodiluição em caldo, foi verificado que as cepas de *Cladosporium* spp. foram inibidas pelas β -glucanases presentes no sobrenadante do cultivo de *W. anomalus*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram evidentemente que ambientes hospitalares, especialmente a Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, consistem, sem dúvida, em fontes de microrganismos fúngicos potencialmente patogênicos durante as 4 estações do ano.

Além disso, concluímos que as micocinas produzidas por *W. anomalus* (WA40) tiveram ação inibitória em todos os fungos anemófilos isolados da UTI Neonatal em meio sólido, e isso pode ser atrelado à ação das β -glucanases. Assim, podemos afirmar que essas micocinas possuem um potencial farmacológico antimicrobiano, podendo futuramente ser utilizadas em formulações para o controle da qualidade do ar em ambientes internos, especialmente aqueles destinados ao atendimento ao paciente.

6. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, A.; SEM, M. M.; GUPTA-BHATTACHARYA, S.; CHANDA, S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. **Environment International**, v. 29, n. 8, p. 1071–1078, 2004.
- ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of NA**, v. 25, n. 1, p. 201–225, 2011.
- 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.
- BANERJEE, T. K.; PATWARI, A. K.; DUTTA, R.; ANAND, V. K.; CHABRA, A. *Cladosporium bantianum* Meningitis in a Neonate. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 69, p. 721–723, 2002.
- BATRA, N.; KAUR, H.; MOHINDRA, S.; SINGH, S.; SHAMANTH, A. S.; RUDRAMURTHY, S. M. *Cladosporium sphaerospermum* causing brain abscess, a saprophyte turning pathogen: Case and review of published reports. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 2, p. 180–184, 2019.
- BAUGHMAN, A. V.; ARENS, E. A. Indoor Humidity and Human Health--Part I: Literature Review of Health Effects of Humidity-Influenced Indoor Pollutants. **ASHRAE Transactions**, v. 102, p. 192–211, 1996.
- BELDA, I. RUIZ, J.; ALONSO, A.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. **Toxins**, v. 9, n. 112, 2017.
- BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; MEIJER, M.; DIJKSTERHUIS, J.; JURJEVI, Z.; ANDERSEN, B.; HOUBRAKEN, J.; CROUS, P. W.; SAMSON, R. A. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 301, p. 177–301, 2018.
- 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, 1963.
- BIEIECKI, S.; GALAS, E. Microbial p-Gfucanases Different From Cellulases. **Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 275–304, 1991.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases — Estimate Precision. **Fournal of Fungi**, p. 1–29, 2017.
- BORBA C. F.; SILVA. M. B. S.; ANDRADE, M. C. L.; NEVES, R. P.; SANTOS, F. A. G.; SILVA, M. N.; LIMA NETO, R. G.; MACEDO, D. P. C. Prospection of airborne fungi and incubator contaminants of a neonatal intensive care unit of a teaching hospital in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 45210-45222, 2021.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **PORTARIA N° 2.616, DE 12 DE MAIO DE 1998**, Brasília, 1998.

BRENIER-PINCHART, M. P.; LEBEAU, B.; QUESADA, J. L.; MALLARETE, M. R.; BOREL, J. L.; MOLLARD, A.; GARBAN, F.; BRION, J. P.; MOLINA, L.; BOSSON, J. L.; CAHN, J. Y.; GRILLOT, R.; PELLOUX, H. Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. **American Journal of Infection Control**, v. 37, p. 631–637, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Medical Mycology**, v. 4, n. 165, 2012.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A. E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: The state of the art, potentialities and limitations. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 749–760, 2007.

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 (Brazil)**, v. 41, n. 2, p. 388–394, 2021.

CALUMBY, R. J. N.; SILVA, J. A.; SILVA, D. P.; MOREIRA, R. T. F.; ARAÚJO, M. A. S. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em Unidade de Terapia Intensiva. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19708–19722, 2019.

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**, v. 9, n. 5, 2014.

CAPPELLI, A.; VALZANO, M.; CECARINI, V.; BOZIC, J.; ROSSI, P.; MENSAH, P.; AMANTINI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2019.

CAPPELLI, A.; FAVIA, G.; RICCI, I. *Wickerhamomyces anomalus* in Mosquitoes: A Promising Yeast-Based Tool for the “Symbiotic Control” of Mosquito-Borne Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–6, 2021.

CECARINI, V.; CUCCIOLONI, M.; BONFILI, L.; RICCIUTELLI, M.; VALZANO, M.; CAPPELLI, A.; AMANTINI, C.; FAVIA, G.; ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M.; RICCI, I. Identification of a killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with β -glucanase activity. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 5–7, 2019.

ČERNÁ, K.; WITTLINGEROVÁ, Z.; ZIMOVÁ, M.; JANOVSÝ, Z. Methods of sampling airborne fungi in working environments of waste treatment facilities. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 29, n. 3, p. 493–502, 2016.

CEUGNIEZ, A.; DRIDER, D.; JACQUES, P.; COUCHENEY, F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. **Food Microbiology**, v. 52, p. 177–184, 2015.

CHEN, Y.; AORIGELE, C.; WANG, C.; SIMUJIDE, H.; YANG, S. Screening and Extracting Mycocin Secreted by Yeast Isolated from Koumiss and Their Antibacterial Effect. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, n. 1, p. 52–56, 2015.

CORDEIRO, P. A. DOS S.; SIQUEIRA, G. K. R.; SILVA, W. M. T.; VIEIRA, P.D. S. Anemophilous fungi associated to the infirmaries environment of a hospital unit of Cabo de Santo Agostinho - PE, Brazil. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 16, p. 1–8, 2021.

CUNHA, A. C.; DOS SANTOS, R. A. C.; RIAÑO-PACHON, D. M.; SQUINA, F. M.; OLIVEIRA, J. V. C.; GOLDMAN, G. H.; SOUZA, A. T.; GOMES, L. S.; GODOY-SANTOS, F.; TEIXEIRA, J. A.; FARIA-OLIVEIRA, F.; ROSSE, I. C.; CASTRO, I. M.; LUCAS, C.; BRANDÃO, R. L. Draft genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* LBCM1105, isolated from cachaça fermentation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1–5, 2020.

DANIEL, H. M.; MOONS, M. C.; HURET, S.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L. *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 63–73, 2011.

DO NASCIMENTO, J. P. M.; LÓPES, A. N. Q.; ARAÚJO, M. A.; ARAUJO, L. A.; SILVA FILHO, E. A. Airborne Fungi in Indoor Hospital Environments. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 01, p. 2749–2772, 2019.

EL-SHARKAWY, M.; NOWEIR, M. Indoor air quality levels in a University Hospital In the Eastern Province of Saudi Arabia. **Journal of Family & Community Medicine**, v. 21, 39-47, 2014.

FLEISCHER, M.; BOBER-GHEEK, B.; BORTKIEWICZ, O.; RUSIECKA-ZIÓLKOWSKAA, J. Microbiological Control of Airborne Contamination in Hospitals. **Indoor and Built Environment**, v. 15, p. 53–56, 2006.

FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; DE OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P.; MOREIRA, Â. N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7953–7961, 2015.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNÜRER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395–402, 2002.

FUENTEFRIA, A. M.; FRANSKOVIKI, I. M.; MERCADO, L. W.; RAMOS, J. P.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P. Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two Brazilian killer yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 87–93, 2006.

GIOVATI, L.; SANTINOLI, C.; FERRARI, E.; CIOCIOLA, T.; MARTIN, E.; BANDI, C.; RICCI, I.; EPIS, S.; CONTI, S. Candidacidal activity of a novel killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against fluconazole-susceptible and resistant strains. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2018.

GIOVATI, L.; Ciociola, T.; Simone, T.; Conti, S.; Magliani, W. *Wickerhamomyces* yeast killer toxins' medical applications. **Toxins**, v. 13, n. 9, 2021.

GNIADEK, A.; MACURA, A.; TWARUZEK, M.; GRAJEWSKI, J. Cytotoxicity of *Aspergillus* strains isolated from the neonatal intensive care unit environment. **Advances in Medical Sciences**, v. 55, n. 2, p. 242–249, 2010.

GONÇALVES, C. L.; MOTAA, F. V.; FERREIRA, G. F.; MENDES, J. F.; PEREIRA, E. C.; FREITAS, C. H.; VIEIRA, J. N.; VILLARREAL, J. P.; NASCENTE, P. S. Airborne fungi in an intensive care unit. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 265–270, 2018.

HOFFMANN, C. C.; DANUCALOV, I. P.; PURIM, K. S. M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infections caused by dematiaceous fungi and their anatomoclinical correlations. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138–141, 2011.

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

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* NCYC 434. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 85–91, 2011.

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

JUNGES, D. S. B.; DELABENETA, M. F.; ROSSETO, L. R. B.; NASCIMENTO, B. L.; PARIS, A. P.; PERSEL, C.; LOTH, E. A.; SIMÃO, R. C. G.; MENOLLI, R. A.; PAULA, C. R.; GANDRA, R. F. Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 2, p. 278–285, 2020.

KAMIMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. DE. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, p. 49–58, 2013.

KASPRZYK, I. Aeromycology – Main research fields of interest during the last 25 years. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 15, p. 1–7, 2008.

KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 13–23, 2011.

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

LOBATO, R. C.; VARGAS, V. DE S.; SILVEIRA, É. DA S. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 11, n. 2, p. 21–28, 2009.

MACEDO, J. I.; KUBOTA, T. H.; MATSUMOTO, L. S.; GIORDANI, A. T.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; MENDES, A. A.; BERTOLINI, D. A. Air quality in a hospital environment. **WIT Transactions on the Built Environment**, v. 134, p. 737–747, 2013.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 369–400, 1997.

MALDONADO-VEGA, M.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; VILLALOBOS, S. S.; CASTELLANOS-ARÉVALO, A. P.; CAMARENA-POZOS, D.; ARÉVALO-RIVAS, B.; VALDÉS-SANTIAGO, L.; HERNÁNDEZ-VALADEZ, L. J.; PEÑA, D. L. G. Bioaerosoles y evaluación de la calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en León, Guanajuato, México. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 30, n. 4, p. 138–143, 2014.

MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P.; CARBONI, G.; ZARA, S.; ZARA, G.; COMITINI, F.; BUDRONI, M.; CIANI, M. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 603–617, 4 jul. 2019.

MARTINS-DINIZ, J. N.; SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 398–405, 2005.

MENEGUETI, M. G.; CANINI, S. R. M. S.; BELISSIMO-RODRIGUES, F.; LAUS, A. M. Avaliação dos Programas de Controle de Infecção Hospitalar em serviços de saúde. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 23, n. 1, p. 98–105, 2015.

MENEZES, C. P. DE; PÉREZ, A. L. A.; LIMA, E. DE O. *Cladosporium* spp : Morphology , infections and pathogenic species. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 23–27, 2017.

MENEZES, C. P. L.; PEREZ, A. L. A. L.; SOUSA, J. P.; PEREIRA, J. A.; PINHEIRO, L.S.; MEDEIROS, M. A. A.; ALVES, M. S.; OLIVEIRA FILHO, A. A. Investigation on mechanism of antifungal activity of citral Against *Cladosporium sphaerospermum* Penz. **Anales de Biologia**, v. 43, p. 43-53, 2022.

MENEZES, E. A.; TRINDADE, E. C. P.; COSTA, M. M.; CÉSAR, C.; FREIRE, F. Airborne Fungi Isolated from Fortaleza City, State of Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 133–137, 2004.

MEZZARI, A.; PERIN, C. SANTOS JÚNIOR, S. A.; BERND, L. A. G. DI GESU, G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 270–273, 2003.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

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

MOLINA, R. T.; GARIJO, M. A. G.; RODRÍGUEZ, A. F. M.; PALACIOS, I. S. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 30, n. 4, p. 232–238, 2002.

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

NAGEEN, Y.; ASEMOLOYE, M. D.; PÖLME, S.; WANG, X.; XU, S.; RAMTEKE, P. W.; PECORARO, L. Analysis of culturable airborne fungi in outdoor environments in Tianjin, China. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

NASCIMENTO, B. L.; DELABENETA, M. F.; ROSSETO, L. R. B.; JUNGES, D. S. B.; PARIS, A. P.; PERSEL, C.; GANDRA, R. F. Yeast Mycocins: a great potential for application in health. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 3, 2020.

OHNISHI, Y. D. O.; PANTOJA, A. S. L.; ABRAÃO, L. S. O.; ALVES, N. G.; OHNISHI, M. D. O.; LIBONATI, R. M. F.; VENTURA, A. M. R. S.; PALACIOS, V. R. C. M. Doenças fúngicas sistêmicas em pacientes internados em um hospital público de referência em Belém, estado do Pará, Amazônia brasileira. **Rev Pan Amaz Saúde**, v. 55, n. 91, p. 1–10, 2022.

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

PARK, D. U.; YEOM, J. K.; LEE, W. J.; LEE, K. M. Assessment of the levels of airborne bacteria, gram-negative bacteria, and fungi in hospital lobbies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 2, p. 541–555, 2013.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 110–118, 2 abr. 2016.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. Ä.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3–13, 2006.

PAULA, C. C.; PASSOS, J. P. C.; VIEIRA, F. C.; SILVA, E. N. C.; LAMARE, C. A. V.; SHYMOYA-BITTENCOURT, W. Colonization of fungal genes in positive hemocultures of hospitalized patients. **Brazilian Journal of Health Review**, p. 9952–9963, 2021.

PEMÁN, J.; ZARAGOZA, R. Revisión Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras. **Rev Esp Quimioter**, v. 26, n. 4, p. 298–311, 2013.

PESCOTT, O. L.; SIMKIN, J. E.; AUGUST, T. A.; RANDLE, Z.; DORE, A. J.; BOTHAM, M. S. Air pollution and its effects on lichens , bryophytes , and lichen-feeding Lepidoptera : review and evidence from biological records. **Biological journal of the Linnean Society**, p. 611–635, 2015.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: A simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 774–780, 1983.

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

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 35–41, 2011.

QUADROS, M. E.; LISBOA, H. M.; OLIVEIRA, V. L.; SCHIRMER, W. N. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 431–438, 2009.

QUDIESAT, K.; ABU-ELTEEN, K.; ELKARMI, A.; HAMAD, M.; ABUSSAUD, M. Assessment of airborne pathogens in healthcare settings. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 2, p. 66-76, 2009.

RĂUT, I.; CĂLIN, M.; CAPRĂ, L.; GURBAN, A. M.; DONI, M.; RADU, N.; JECU, L. *Cladosporium* sp . Isolate as Fungal Plant Growth Promoting Agent. **Agronomy**, v. 11, 2021.

RICHARDSON, M. D.; COLE, D. C. Special Issue “Fungal Burden in Different Countries”. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 80, p. 1–2, 2018.

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

ROSADO, A. W. C.; CUSTÓDIO, F. A.; PINHO, D. B.; FERREIRA, A. P. S. PEREIRA, O. L. *Cladosporium* species associated with disease symptoms on *Passiflora edulis* and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. **Phytotaxa**, v. 409, n. 5, p. 239–260, 2019.

ROSSETO, L. R. B.; MARTELLI, E. C.; SILVA, J. C.; NASCIMENTO, B. L.; JUNGES, D. S. B.; DELABENETA, M. F.; PARIS, A. P.; AULER, M. E.; MENOLLI, R. A.; SIMÃO, R. C. G.; PAULA, C. R.; GANDRA, R. F. Susceptibility of *Candida albicans* Strains Isolated from Vaginal Secretion in Front of the Mycocins of *Wickerhamomyces anomalus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, p. 595–601, 2022.

SALES, E.; SALES, E.; DIAS, .; COSTA, F.; LOYOLA, A. Airborne fungi in an intensive care units and a surgical center of a university hospital. **Bioikos**, v. 25, p. 109–115, 1 dez. 2011.

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

SILVA, D. D. M. C.; MARCUSSO, R. M. N.; BARBOSA, C. G. G.; GONÇALVES, F. L. T.; CARDOSO, M. R. A. Air pollution and its impact on the concentration of airborne fungi in the megacity of São Paulo, Brazil. **Heliyon**, v. 6, 2020.

SILVA, L. B.; POZZER, B. S.; ECKER, C. C.; XAVIER, M. O. Monitoring airborne fungi in the intensive care unit airborne fungi in the hospital unit. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 11, n. 3, p. 27–34, 2017.

SMITH, J.; ADAMS, C. E.; KING, M. F.; NOAKES, C. J.; ROBERTSON, C.; DANCER, S. J. Is there an association between airborne and surface microbes in the critical care environment? **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. e123–e129, 2018.

SONG, D.; CHENG, Y.; LI, X.; WANG, F.; LU, Z.; XIAO, X.; WANG, Y. Biogenic Nanoselenium Particles Effectively Attenuate Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelial Barrier Injury by Activating the Nrf2 Antioxidant Pathway. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 17, p. 14724–14740, 2017.

SOUZA, A.; NASCIMENTO, J.; ARAÚJO, M.; PEDROSA, K.; TENORIO, B.; PIRES, L.; LIMA, G.; BARBOZA, R.; FILHO, E.; Airborne fungi in Neonatal Intensive Care Unit of a Public Hospital in Brazil. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, p. 1210-1219, 2019.

STEWART, G. G. Killer (Zymocidal) Yeasts. In: **Brewing and Distilling Yeasts**. Springer, Cham, 2017. p. 189–198.

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

TANG, W.; KUEHN, T. H.; SIMCIK, M. F. Effects of Temperature, Humidity and Air Flow on Fungal Growth Rate on Loaded Ventilation Filters. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 12, n. 8, p. 37–41, 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**, v. 14, p. 439, 2014.

TONG, X.; XU, H.; ZOU, L.; CAI, M.; XU, X.; ZHAO, Z.; XIAO, F.; LI, Y. High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. June 2016, p. 1–8, 2017.

TROF, R. J.; BEISHUIZEN, A.; GIRBES, A. R. J.; GROENEVELD, A. B. J. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. **Intensive care Med**, v. 33, n. 10, p. 1694–1703, 2007.

VALZANO, M.; CECARINI, V.; CAPPELLI, A.; CAPONE, A.; BOZIC, J.; CUCCIOLONI, M.; EPIS, S.; PETRELLI, D.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A. M.; FAVIA, G.; RICCI, I. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, 2016.

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

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, n. 3, p. 213–222, 1995.

WEILER, F.; SCHMITT, M. J. Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 1, p. 69–76, 2003.

YU, H.; MA, Z.; MENG, S.; QIAO, S.; ZENG, X.; TONG, Z.; JEONG, K. C. A novel nanohybrid antimicrobial based on chitosan nanoparticles and antimicrobial peptide microcin J25 with low toxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117309, 2021.

ZIMOWSKA, B.; BECCHIMANZI, A.; NICOLETTI, R.; DOROTA, E.; FURMANCZYK, A.; BENSCH, K. New *Cladosporium* Species from Normal and Galled Flowers of Lamiaceae. **Pathogens**, v. 10, n. 3, 2021.

ZOPPAS, B. C. DE A.; VALENCIA-BARRERA, R. M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, D. *Cladosporium* spp spores distribution in the atmospheric air of Caxias do Sul-RS, Brazil, during a two-year study. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 34, n. 2, p. 55–58, 2011.