

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, *Campus* CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos frente às micocinas de
Wickerhamomyces anomalus ambientais

ANA PAULA PARIS

Cascavel

2015

ANA PAULA PARIS

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos frente às micocinas de
Wickerhamomyces anomalus ambientais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

Cascavel

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P259s

Paris, Ana Paula

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos frente às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* ambientais. / Ana Paula Paris.— Cascavel, 2015.

91 p.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. *Wickerhamomyces anomalus*. 2. Micocina. 3. Atividade antimicrobiana. I. Gandra, Rinaldo Ferreira. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 615.329

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

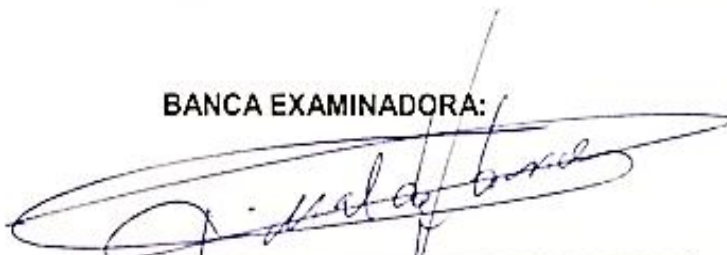
ANA PAULA PARIS

SUSCEPTIBILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS FRENTE ÀS
MICOCINAS DE *Wickerhamomyces anomalus* AMBIENTAIS


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. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

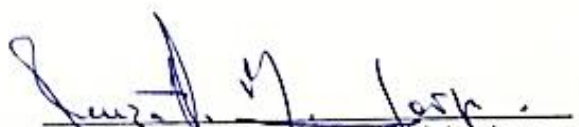
BANCA EXAMINADORA:



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



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



Profa. Dr. Tereza Cristina Marinho Jorge –
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Banca

CASCADEL – PR
2015

BIOGRAFIA RESUMIDA

ANA PAULA PARIS

- Nascimento: 27.08.1990 – Coronel Vivida – PR
- Filiação: Pedro Paris
Geneci Marsaro Paris
- 2008/2009: Curso de Graduação em Farmácia – União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP) – Dois Vizinhos - PR
- 2010/2013: Curso de Graduação em Farmácia – Instituto Federal do Paraná (IFPR) – *Campus* Palmas – PR
- 2014/2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – *Campus* Cascavel - PR

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre guiando o meu caminho.

Aos meus amados pais, Pedro e Geneci, por todo amor e por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me propiciar momentos maravilhosos e pessoas tão especiais no meu caminho e a mãe Maria pelo seu amor, por sempre fortalecer a minha fé e me acolher nos momentos de dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Rinaldo F. Gandra pela oportunidade, apoio, orientação, paciência, ensinamentos e por me instigar a atingir o desafio lançado.

Ao professor Rodrigo Hinojosa Valdez por me incentivar a fazer o Mestrado.

A todo o pessoal do laboratório de Micologia, a minha colega Cristiane, aos alunos de iniciação científica Jéssica, Carol, Mateus e Jackson, as estagiárias Jéssica, Barbara, Carol, Rayssa e Jéssica Engel e aos estagiários do LACEP Greicy, Natália e Guilherme pela ótima convivência, que tornaram meu trabalho mais leve e gostoso, por me escutarem e ajudarem nas dificuldades e desafios encontrados nessa etapa. Carrego comigo um pouquinho de cada um de vocês.

A Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

As minhas colegas da Pós-Graduação Jaina, Amanda e Fernanda pela ajuda, compreensão, carinho e companheirismo.

As minhas eternas amigas de infância Danielle, Jeniffer e Glaucya pelas energias positivas transmitidas, por todo amor, palavras de incentivo e pelos momentos inesquecíveis.

As minhas amigas Aline, Vanessa, Ialle, Cledes, Lilian, Gabriele e Caroline por cada palavra, apoio, compreensão, carinho e que mesmo de longe sempre torceram por mim.

As minhas primas Giulianna e Ana Cláudia pelo amor e incentivo.

Ao meu namorado pelo carinho, compreensão, incentivo, amizade e por estar sempre ao meu lado me apoiando.

Aos meus pais pelo amor incondicional, paciência infinita e por serem meus exemplos de luta, honestidade, persistência e fé.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Micocinas	5
3.2 Aplicação das leveduras e suas micocinas	6
3.3 <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	8
3.4 Leveduras no meio ambiente.....	9
3.5 Leveduras de importância clínica.....	9
3.5.1 Gênero <i>Candida</i>	10
3.5.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	12
3.6 Bactérias de importância clínica.....	12
3.7 Resistência de micro-organismos a terapia antimicrobiana disponível	13
4 REFERÊNCIAS	15
5 CAPÍTULO I: Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos às micocinas de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	23
6 CAPÍTULO II: Susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> isolados de sangue frente ao extrato de micocinas da parede celular de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	39
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	57
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
ANEXO 1: NORMAS DA REVISTA YEAST	59
ANEXO 2: NORMAS DA REVISTA PLOS ONE.....	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Ação inibitória das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 presentes nos sobrenadantes da cultura das 03 cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) isoladas do ambiente frente aos micro-organismos patogênicos. 36
- Tabela 1 Percentual de susceptibilidade de 30 cepas de *C. albicans* isoladas de sangue frente a diferentes concentrações dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92. 46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ação citotóxica das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 comparadas com anfotericina B. 38
- Figura 1 Análise bioquímica da concentração de proteínas e carboidratos presentes nos extratos de micocinas da parede celular das cepas WA40, WA45 e WA92 de *W. anomalus*. 54
- Figura 2 Viabilidade de *C. albicans* após contato com os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 na concentração de 400 µg.mL⁻¹. 55
- Figura 3 Ação citotóxica dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 comparadas com anfotericina B. 56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau (s) Celsius
µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
µm	Micrometro (s)
A	Absorbância
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic local alignment search tool
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
g	Gramma (s)
h	Horas (s)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDS	Infectious Diseases Society of America
ITS	Internal transcription sites
K	Potássio
kDa	Quilodalton (s)
m/v	Massa/volume
min	Minutos (s)
mL	Mililitro(s)
nm	Nanometro (s)
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salina)
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UFC	Unidades formadoras de colônia

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos frente às micocinas de
Wickerhamomyces anomalus ambientais

O expressivo aumento da incidência e prevalência de resistência de micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos tem se tornado um grande problema de saúde pública, tornando-se importante a pesquisa de novos compostos terapêuticos contra essa ameaça. Micocinas produzidas por algumas leveduras, como *Wickerhamomyces anomalus*, possuem atividade contra outros micro-organismos, ação que possivelmente ocorre após a ligação da micocina a receptores específicos na parede celular e na membrana plasmática dos micro-organismos sensíveis e assim, apresentando uma promissora atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho é avaliar a ação antimicrobiana de micocinas presentes no sobrenadante de cultura e na parede celular de cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) frente às leveduras e bactérias patogênicas. As três cepas de *W. anomalus* foram isoladas do solo. As micocinas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 foram testadas frente às bactérias *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* e às leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. As micocinas do sobrenadante de cultura e da parede celular das três cepas de *W. anomalus* apresentaram efeito inibitório nos micro-organismos testados e mostraram pouca toxicidade em teste de hemólise em eritrócitos humanos. As micocinas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 apresentaram um amplo espectro de ação podendo ser promissores no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos.

Palavras-chave: *W. anomalus*, micocina, atividade antimicrobiana.

Susceptibility of pathogenic microorganisms against micocyns of environmental
Wickerhamomyces anomalus

The significant increase in the incidence and prevalence of pathogenic microorganism resistance to antimicrobials has become a major public health problem, making it important to search for new therapeutic compounds against this threat. Micocyns produced by some yeasts, like *Wickerhamomyces anomalus*, have activity against other microorganisms, action which possibly occurs after the binding of micocyn to specific receptors on cell wall and plasma membrane of sensitive microorganisms and thus, presenting a promising antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of micocyns present in the culture supernatant and in the strain cell walls of *W. anomalus* (WA40, WA45 and WA92) opposite the yeast and bacteria. The three strains of *W. anomalus* were isolated from the soil. The micocyns of *W. anomalus* WA40, WA45 and WA92 were tested against the bacteria *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans*. The mycocins of the three strains of *W. anomalus* showed inhibitory effect on the tested microorganisms and micocinas showed a little toxicity in haemolysis test on human erythrocytes. The micocyns of *W. anomalus* WA40, WA45 and WA92 presented a broad spectrum of action which may be promising in the development of antimicrobial drugs.

Keywords: *W. anomalus*, micocyn, antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

Algumas leveduras possuem a capacidade de inibir o crescimento de outros micro-organismos, como outras leveduras, fungos e bactérias, sem interferir no seu próprio crescimento. Essas leveduras são chamadas de leveduras produtoras de micocinas ou leveduras *killer* e a ação destas é caracterizada pela secreção de micocinas, também conhecidas como toxinas *killer*, que são glicoproteínas letais a alguns micro-organismos após a ligação das mesmas aos receptores específicos presentes na parede celular e na membrana plasmática dessas leveduras sensíveis. As leveduras produtoras de micocinas podem ser isoladas de diversas fontes naturais e suportam bem o estresse ambiental. Além disso, têm um simples requerimento nutricional, alta reprodutibilidade e conhecida inocuidade ao homem.

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura que pode ser isolada de solo, água, flores, plantas, insetos, ambientes marinhos e animais. As micocinas produzidas por *W. anomalus* apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, alta estabilidade em comparação as micocinas de outras leveduras, sendo de grande destaque seu potencial uso na ciência, saúde e biotecnologia.

Diferentes gêneros e espécies de leveduras e bactérias podem ser causadores de infecções, principalmente quando o mecanismo de defesa natural do ser humano é interrompido ou insuficiente. Sendo importantes causadores de morbidade e mortalidade apresentando uma grande ameaça à saúde pública no mundo. Importantes leveduras causadoras de doenças pertencem ao gênero *Candida* e *Cryptococcus*, já entre as bactérias, as espécies *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* são frequentes causadores de infecção.

Com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e com o aumento do número de micro-organismos multirresistentes no mundo, faz-se, cada vez mais, necessário à busca por novas substâncias antimicrobianas eficazes e seguras. As micocinas de *W. anomalus* são de grande potencial no desenvolvimento de uma nova droga antifúngica devido ao seu amplo espectro de ação. Desse modo, a avaliação da atividade de micocinas secretadas pela levedura *W. anomalus*, isoladas do meio ambiente, frente a importantes patógenos é de grande valia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da atividade antimicrobiana das micocinas presentes no sobrenadante e na parede celular de 03 cepas ambientais de *Wickerhamomyces anomalus* WA40, WA45 e WA92, isoladas do meio ambiente, frente bactérias e leveduras patogênicas.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de micocinas a partir do sobrenadante de cultura das três cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92;
- Obtenção de micocinas a partir da parede celular das três cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92;
- Avaliação da atividade das micocinas presentes no sobrenadante de cultura de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 frente às bactérias *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* e às leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*;
- Avaliação da atividade de micocinas presentes na parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 frente a 30 cepas de *Candida albicans* isoladas de sangue;
- Análise da toxicidade das micocinas do sobrenadante da cultura e da parede celular de *W. anomalus* WA 40, WA45 e WA92 em eritrócitos humanos;
- Análise da viabilidade de células de *C. albicans* em contato com as micocinas da parede celular de *W. anomalus* WA 40, WA45 e WA92.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micocinas

Algumas leveduras são capazes de produzir micocinas, que também são conhecidas como toxinas *killer*. Essas micocinas, possuem grande biodiversidade quanto as suas características bioquímicas, genéticas e do seu modo de ação (MAGLIANI *et al.*, 1997). Apesar dessa diversidade, todas as micocinas conhecidas são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas tóxicas a micro-organismos eucariotos ou procariotos sensíveis (BUZDAR *et al.*, 2011). A ação das micocinas ocorre por meio de efeitos letais, após a ligação da micocina a receptores específicos na parede celular e na membrana plasmática (PUCHKOV *et al.*, 2001; GOLUBEV, 2006). Em seguida, ocorre a translocação para o citoplasma, onde as micocinas causam aumento da permeabilidade da membrana plasmática, levando ao extravasamento de íons potássio, ATP e metabólitos; inibição da síntese de DNA, quitina, manoses e de β -1,3-glucano; interrupção da fase G1 do ciclo celular (SANTOS *et al.*, 2002; SANTOS; MARQUINA, 2004; GOLUBEV, 2006; LIMA *et al.*, 2013).

As leveduras produtoras de micocinas podem estar presentes em diversos habitats como folhas, flores, frutos, solos, sedimentos, águas, animais e no homem, ocorrendo com maior frequência nos que possuem alta densidade populacional, no qual a competição por nutrientes é mais intensa (GOLUBEV *et al.*, 2002; CABRAL *et al.*, 2009; BUZDAR *et al.*, 2011). Estas micocinas podem conferir, em habitat natural, vantagens na competição com outros micro-organismos, facilitando o acesso aos nutrientes presentes no substrato para as leveduras que as produzem, entretanto seu papel ainda não está completamente elucidado (FREDLUND *et al.*, 2002).

As micocinas são produzidas durante o metabolismo secundário e o seu potencial é avaliado através da inibição do crescimento de outros micro-organismos, como outras leveduras, fungos e bactérias, sem interferir no seu próprio crescimento (GOLUBEV, 2006; CABRAL *et al.*, 2009).

A expressão das micocinas podem sofrer alterações dependendo 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 podem ser diferentes dependendo das condições específicas de cada gênero, espécie ou linhagens de leveduras produtoras de micocinas (MAGLIANI *et al.*, 1997; FUENTEFRIA *et al.*, 2006; BUZZINI *et al.*, 2007).

Esse fenômeno de inibição foi descoberto por BEVAN e MAKOWER (1963) em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, desde então, diversos gêneros como: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis* e *Williopsis*, foram relatadas por demonstrarem essa ação inibitória frente a outros micro-organismos (KANDEL; STERN, 1979; MIDDELBEEK *et al.*, 1980; HODGSON *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2000; COMITINI *et al.*, 2004; BUZZINI *et al.*, 2007; ROBLEDO-LEAL *et al.*, 2012). Na natureza existem três fenótipos distintos de leveduras: *killer*, sensíveis e neutras. As cepas com atividade *killer* são as que produzem micocinas que inviabilizam as células sensíveis da mesma espécie, ou de espécies distintas, sem que ocorra o contato direto entre as células. As leveduras sensíveis são aquelas que não produzem micocinas e são inviabilizadas pela ação das micocinas das leveduras *killer*, enquanto as neutras são aquelas que não possuem a capacidade de produzir micocinas, mas que são imunes a elas (BEVAN; MAKOWER, 1963; BUZZINI *et al.*, 2007).

3.2 Aplicação das leveduras e suas micocinas

As leveduras produtoras de micocinas vem se destacando pela sua aplicabilidade em setores diversos, como na indústria de alimentos, agricultura, proteção do meio ambiente e medicina.

Na indústria alimentícia, o controle da deterioração de alimentos e bebidas causadas pelas leveduras dos gêneros *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* e *Zygosaccharomyces* pode ser feito por micocina secretada por *Pichia kluyveri* isolada do solo na Argélia (LABBANI *et al.*, 2015). Na produção de vinhos, micocina purificada de *Kluyveromyces phaffii* impede a contaminação por cepas de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, as quais refermentam o produto após o fim do processo industrial (COMITINI *et al.*, 2004). LOWES *et al.* (2000) verificaram que micocina produzida por *Williopsis mrakii*

apresentou melhor resultado na inibição da deterioração do iogurte por leveduras do que os principais conservantes utilizados na indústria.

Na agricultura diversas leveduras produtoras de micocinas como *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *S. cerevisiae* e *Aureobasidium pullulans* apresentaram atividade no controle dos fitopatógenos *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*, causadores de doenças em laranjas, mamão e uva (MASIH *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2013; ALOUI *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2015; PARAFATI *et al.*, 2015).

No meio ambiente, a levedura *Metschnikowia bicuspidata* patogênica no caranguejo foi inibida por micocinas produzidas pelas leveduras *Williopsis saturnus*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii* e *A. pullulans* (WANG *et al.*, 2008). GUO *et al.* (2013) demonstraram que diversos micro-organismos isolados do ambiente marinho foram susceptíveis a micocina purificada de *W. anomalus*, isolada do mar.

No âmbito da saúde, a micocina secretada pela levedura *Zygosaccharomyces bailii*, apresentou atividade frente a isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Sporothrix schenckii* e também foi capaz de inibir o crescimento do fungo filamentoso fitopatogênico *Fusarium oxysporum* (WEILER; SCHMITT, 2003). Assim como, micocina produzida por *W. mrakii* demonstrou ação contra cepas clinicamente importantes de *Candida* (HODGSON *et al.*, 1995). As micocinas possuem excelente ação antibacteriana contra importantes patógenos, como é o caso da micocina produzida por *Pichia kudriavzevii* RY55 frente à *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (BAJAJ *et al.*, 2013).

As micocinas podem ser utilizadas como método de biotipagem de fungos e bactérias (fenótipo *killer*), principalmente com finalidade epidemiológica (MORACE *et al.*, 1989; BUZZINI *et al.*, 2007). Essas leveduras juntamente com suas micocinas, proporcionaram um modelo para estudo e entendimento do mecanismo de secreção e excreção de proteínas extracelulares e também na identificação dos receptores das miconas na parede celular de outras leveduras (COMITINI *et al.*, 2004).

3.3 *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura, agora denominada, *W. anomalus* já foi chamada de *Hansenula anomala* e *Pichia anomala* e pertence a classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e a família *Wickerhamomycetaceae*. Sendo, a sua forma anamórfica conhecida como *Candida pelliculosa* (KURTZMAN *et al.*, 2011).

W. anomalus se adapta facilmente a diferentes condições de crescimento como, temperaturas de 3 a 37 °C, pH de 2 a 12 e em diferentes osmolaridades (FREDLUND *et al.*, 2002). Sendo assim, a levedura consegue se desenvolver em diversos habitats, como em plantas, flores, cascas de frutas, alimentos, óleo contaminado, laticínios, águas residuais, tecidos humanos, ambientes marinhos, animais e insetos (WALKER *et al.*, 1995; CAPPELLI *et al.*, 2014).

Supostamente, a capacidade de *W. anomalus* de inibir o crescimento de outros micro-organismos ocorre pela síntese de alguns compostos (acetato de etila, acetato de isoamila e propionato de etila) e/ou pela produção e excreção de glicoproteínas (micocinas). Contudo, até hoje pouco se sabe sobre como causa à morte das células sensíveis (POLONELLI; MORACE, 1986; CAILLIEZ *et al.*, 1994; WALKER *et al.*, 1995; PASSOTH *et al.*, 2011).

A micocina produzida por *W. anomalus* destaca-se pelo amplo espectro de atividade antimicrobiana e também por apresentar alta estabilidade quando comparada às micocinas de outras leveduras (SÉGUY *et al.*, 1998; IZGÜ *et al.*, 2005). A sua importância na indústria alimentícia é decorrente da capacidade de se desenvolver em condições de alta pressão osmótica e baixo pH, podendo ser utilizada como aromatizante de alimentos, na produção de alimentos bioemulsificantes e também no melhoramento no aroma do vinho (PASSOTH *et al.*, 2006). Assim como, decorrente da sua ação antifúngica, também vem se destacando como importante agente no biocontrole de fungos de interesse agrônômico (WALKER, 2011).

Em clínica médica, essa levedura apresenta potencial para uso terapêutico da sua micocina com ação antimicrobiana devido a ampla atividade frente a outras leveduras e bactérias, incluindo importantes patógenos como *C. albicans* (MAGLIANI *et al.*, 1997).

3.4 Leveduras no meio ambiente

As leveduras fazem parte de diversos processos nos ecossistemas terrestres e ao longo dos anos, com a ajuda de tecnologias moleculares, pode-se descobrir a diversidade de eucariotos presentes em vários habitats (DAMON *et al.*, 2010; AGUILERA, 2013). Elas estão presentes em diferentes biomas, sendo encontrados na atmosfera, no fundo dos oceanos, em aquíferos, gelo glacial, associados a algas, plantas e animais. Nos solos, as leveduras são importantes na decomposição da matéria orgânica, fazendo com que ocorra o ciclo dos nutrientes e assim, promovendo a fertilidade (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; MARGESIN *et al.*, 2014).

O ambiente aquático é outro habitat comum das leveduras. Contudo, a ecologia de leveduras presentes na água doce possui grandes lacunas, como, o fator de distribuição, a diversidade e qual é a sua real importância nesse sistema. As leveduras comumente isoladas de água doce, estão relacionadas com os seres humanos e animais, e algumas são pertencentes ao gênero *Candida* os quais são patógenos oportunistas e estão correlacionados como indicadores de contaminação fecal (MEDEIROS *et al.*, 2012).

3.5 Leveduras de importância clínica

A ocorrência de doenças causadas por leveduras patogênicas tiveram um expressivo aumento depois da ocorrência mundial da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Além da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) fatores como: a facilidade de viagens internacionais, o crescimento populacional, o descaso em medidas de saúde pública, as imigrações e o envelhecimento da população contribuíram para a diversificação dos agentes etiológicos. Essa diversidade permitiu que a maioria dos fungos se tornassem capazes de crescer em temperaturas próximas da temperatura corporal (37 °C) que facilitou a incidência de micoses, tornando as leveduras importantes causadores de mortalidade e morbidade em pacientes com a imunidade comprometida (KURTZMAN *et al.*, 2011; OLORODE; OKPOKWASLI, 2012).

Fungos de diferentes gêneros e espécies podem ser causadores de infecções em órgãos, como a pele, ou de forma sistêmica quando o mecanismo de defesa natural

do ser humano é interrompido ou insuficiente. Os principais causadores de doenças entre os fungos são as leveduras, destacando-se os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. A terapia das infecções fúngicas vem enfrentando dificuldades, deste modo, há uma importância crescente na verificação *in vitro* da atividade dos antifúngicos em uso na clínica e na pesquisa de novas drogas frente leveduras (KURNATOWSKA; KWAŚNIEWSKA, 2009).

3.5.1 Gênero *Candida*

As leveduras abrangem a maioria dos fungos ascomicetos causadores de doenças e a grande maioria pertence ao gênero *Candida* (KURTZMAN *et al.*, 2011). Esse gênero foi isolado pela primeira vez no ano de 1844 no escarro de um paciente tuberculoso. São organismos eucariotos, com parede celular externa à membrana plasmática, sendo que esta é formada por esteróis, geralmente ergosterol. Elas metabolizam a glicose em condições aeróbias e anaeróbias e crescem em temperaturas próximas de 37 °C, o que permite o seu desenvolvimento no hospedeiro (SINGH *et al.*, 2014).

Espécies de *Candida* se relacionam de forma comensal, habitando as cavidades oral e vaginal, vias respiratórias, trato gastrointestinal e a pele de seres humanos e animais (MISHRA *et al.*, 2007). Por serem fungos oportunistas, podem tornar-se patogênicos e atingir mucosas e tecidos mais profundos, causando doenças de gravidade variável (SARDI *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, a ocorrência de candidíases tornou-se muito comum, isso se deve a vários fatores, como o uso de imunossupressores no tratamento de diversas doenças, assim como a SIDA. Uma evidência do significado de *Candida* como agente infeccioso é a quantidade de trabalhos publicados na literatura médica, demonstrando sua importância à saúde pública e mostrando a necessidade de mais atenção dos clínicos e dos pesquisadores (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Candida spp. multirresistentes a diversas drogas durante o curso da terapia tem como uma das causas o tratamento mal sucedido com antifúngicos (MISHRA *et al.*, 2007; BHARTI *et al.*, 2012). Nos hospitais dos Estados Unidos, o gênero *Candida* está entre as cinco causas mais comuns de infecções da corrente sanguínea,

principalmente em pacientes da unidade de terapia intensiva (LEWIS, 2009). Mesmo com tratamento antifúngico, a mortalidade e a morbidade por *C. albicans* é elevada em pacientes com infecção sistêmica (LUO *et al.*, 2015).

O fungo *C. albicans* é a espécie mais notável do gênero *Candida*. Fazendo parte da microbiota em mais da metade da população mundial, estando presente nas mucosas do trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis. No entanto, pode ocasionar infecções potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos devido a fatores como a SIDA, transplante de órgãos e tratamento quimioterápico do câncer. Além disso, *C. albicans* está entre as principais causadoras de infecções nosocomial (MCMANUS; COLEMAN, 2014; WANG *et al.*, 2014; LEHNERT *et al.*, 2015).

Os fatores de virulência de *C. albicans* são importantes na patogênese, tornando a levedura menos sensível ou insensível ao sistema imune e aos fármacos antifúngicos. Alguns desses fatores são: a aderência às células do hospedeiro, enzimas extracelulares (fosfolipases e proteases), transição levedura-hifa e a formação de biofilme, que também ajuda na instalação da infecção e na resistência do micro-organismo, permitindo que a mesma permaneça por mais tempo no corpo do hospedeiro (OLORODE; OKPOKWASLI, 2012; KAVANAUGH *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; SEIFI *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2015).

Segundo BHATTACHARYYA *et al.* (2013) tanto nos países em desenvolvimento, como nos desenvolvidos, a principal espécie do gênero *Candida* causadora de infecções invasivas é a *C. albicans*. Entretanto, nas últimas décadas, espécies não albicans como *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* também estão exibindo um número significativo como agentes causais de candidemia, e estão apresentando resistência aos antifúngicos triazólicos clássicos (como fluconazol) e aos triazóis mais recentes, necessitando o uso de equinocandinas, que são antifúngicos de primeira linha. A Infectious Diseases Society of America (IDSA) preconizou a equinocandina como terapia primária em casos de candidíase moderadamente grave e em pacientes com possível infecção de cepa resistente a triazol. Podendo surgir *Candida* spp. resistentes a esse antifúngico (LEWIS, 2009).

3.5.2 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é responsável pela criptococose, infecção que acomete principalmente pacientes com a imunidade prejudicada, em especial os com SIDA, diabetes mellitus e transplantados (CORTI *et al.*, 2014). Estima-se que mais de 1 milhão de novas infecções por *C. neoformans* ocorrem por ano no mundo e que cerca de 600.000 pacientes morrem de criptococose sistêmica (KIM *et al.*, 2015; OST *et al.*, 2015).

Esta infecção normalmente ocorre pela inalação de células que se encontram no ambiente como basidiósporos ou leveduras fracamente encapsulados. A partir dos pulmões, pode infectar a corrente sanguínea e causar infecção disseminada comumente no sistema nervoso central, trato genito-urinário, na pele e em tecidos moles (ORSINI *et al.*, 2015). As opções de terapias para o tratamento de criptococose são restritas. Entre os antifúngicos para essa infecção encontra-se os polienos (à base de anfotericina B), flucitosina (antimetabólitos) e azoles. Contudo, o tratamento de criptococose vem encontrando problemas como a toxicidade das drogas disponíveis e a resistência antifúngica (GONTIJO *et al.*, 2014).

3.6 Bactérias de importância clínica

A adaptação de patógenos bacterianos ao ambiente hospitalar também se tornou uma ameaça à saúde pública no mundo (HSU *et al.*, 2015). As infecções causadas por micro-organismos multirresistentes ocasionam um importante aumento de morbidade e mortalidade (POGORZELSKA-MAZIARZ *et al.*, 2015). Além disso, o número de infecções de difícil tratamento só vem aumentando, sendo que, as causadas por Gram-negativos multirresistentes como *E. coli* e *Acinetobacter baumannii* as mais preocupantes, assim como, *S. aureus* (Gram-positiva) resistente à meticilina é uma grande ameaça em diversos países (DRAENERT *et al.*, 2015).

S. aureus é uma bactéria, Gram-positiva, que faz parte da microbiota da pele e de mucosas do ser humano, mas por ser um patógeno oportunista é responsável por doenças tanto em hospitais como na comunidade (KANT *et al.*, 2015). Nas últimas décadas, *S. aureus* multirresistentes a meticilina pode ser encontrado comumente na comunidade em academias, escolas, populações com imunodeficiências,

militares (MURPHY *et al.*, 2013). No ambiente hospitalar é uma das principais infecções que acometem pacientes com enfermidades críticas, em recém-nascidos hospitalizados o *S. aureus* é o segundo maior causador de infecções e é responsável por várias infecções com taxas de até 64% de morbidade e mortalidade (POPOOLA *et al.*, 2014; VIRAY *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2015). Sua importância nas infecções se deve a capacidade de colonização nas células humanas, aos seus fatores de virulência e a resistência a drogas (penicilina, meticilina e sensibilidade intermediária a vancomicina) (RINCÓN *et al.*, 2014).

E. coli é uma bactéria que pertence a microflora do intestino do homem, mas algumas cepas desse patógeno podem ser fatais, devido aos fatores de virulência pode causar doenças no trato intestinal, trato urinário, pneumonia, meningite neonatal e na corrente sanguínea. Devido ao aumento do uso de antibióticos essa bactéria já é resistente a diversos antibióticos dificultando o tratamento de infecções do trato urinário e se tornaram grandes causadores de morbidade do que de mortalidade (KAPER *et al.*, 2004; AHANGARKANI *et al.*, 2015; GOESER *et al.*, 2015; HAMDAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Outra bactéria oportunista é a *A. baumannii* que desenvolve graves infecções, como pneumonia, bacteremia, infecções do trato urinário, meningite e septicemia, principalmente em pacientes com a imunidade debilitada (HASAN *et al.*, 2015). Desde 1970 a difusão de cepas resistentes tornou-se uma preocupação constante no ambiente hospitalar e na última década também vem sendo relatados casos na comunidade com maior frequência (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). *A. baumannii* é capaz de sobreviver em ambientes hostis e de desenvolver rapidamente fatores de resistência o que vem implicando em infecções e surtos em todo o mundo de cepas multirresistentes (LIN; LAN, 2014).

3.7 Resistência de micro-organismos a terapia antimicrobiana disponível

Nas últimas décadas o expressivo aumento na incidência e prevalência de resistência de micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos tornou-se um grave problema de saúde pública. Essa frequência na resistência tem sido conferida, principalmente, ao uso exacerbado e inadequado de drogas antimicrobianas. Com

frequência, cepas resistentes estão associadas a infecções que causam o aumento da morbidade, mortalidade e dos custos na área da saúde (CONTI *et al.*, 2000; MAGLIANI *et al.*, 2004).

A última classe de antifúngicos a ser criada foi a equinocandina e isso ocorreu há mais de vinte anos (IANIRI; IDNURM, 2015). E em meio a novas moléculas pesquisadas estão às micocinas produzidas por leveduras, que são candidatas em potencial devido ao seu amplo espectro de atividade (TAN; TAY, 2011). Visto que, uma das principais opções é o desenvolvimento de novas terapêuticas frente a micro-organismos multirresistentes e com menos toxicidade para o ser humano.

4 REFERÊNCIAS

AGUILERA, A. Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. **Life**, Basel, v. 3, n. 3, p. 363–374. 2013.

AHANGARKANI, F.; RAJABNIA, R.; SHAHANDASHTI, E. F.; BAGHERI, M.; RAMEZ, M. Frequency of class 1 integron in *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in north of iran. **Mater. Sociomed.**, Sarajevo, v. 27, n. 1, p. 10–12. 2015.

ALOUI, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 200, p. 22–30. 2015.

ARAUJO, A. R. de.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; LIMA, L. I. de; SÁ, M. C.; NUNES, P. H. M.; JOANITTI, G. A.; EATON, P.; SOARES, M. J.; SOUZA, J. R. de A. L. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, London, v. 14, n. 1, p. 25. 2015.

BAJAJ, B. K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 53, n. 8, p. 645–56. 2013.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. **The physiological basis of the killer character in yeast.** In: XIth Int. Congr. Genet., Pergamon Press, Oxford: J. Genetics, v. 1, p. 202–203. 1963.

BHARTI, P.; ANAND, V.; CHANDER, J.; SINGH, I. P.; SINGH, T. V.; TEWARI, R. Heat stable antimicrobial activity of *Burkholderia gladioli* OR1 against clinical drug resistant isolates. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 135, n. 5, p. 666–671. 2012.

BHATTACHARYYA, 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*. **J. Clin. Diagn. Res.**, India, v. 7, n. 10, p. 2167–2169. 2013.

BUZDAR, M. A.; CHI, Z.; WANG, Q.; HUA M, X.; CHI, Z. M. Production, purification, and characterization of novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against apathogenic yeast in crab. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, v. 91, n. 6, p.1571–1579. 2011.

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 Res.**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 749–760. 2007.

CABRAL, A. S.; CARVALHO, P. M. B.; PINOTTI, T.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. Killer yeasts inhibit the growth of the

phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease. **Brazilian J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 108–110. 2009.

CAILLIEZ, J. C.; SÉGUY, N.; ALIOUAT, E. M.; POLONELLI, L.; CAMUS, D.; DEICAS, E. The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Med. Hypotheses**, New York, v. 43, n. 3, p. 167–171. 1994.

CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; EPIS, S.; GABRIELLI, M. G.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; BANDI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. 1-9. 2014.

CHEN, W. B.; HAN, Y. F.; JONG, S. C.; CHANG, S. C. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5348–5352. 2000.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. **Microbiology**, Reading, v. 150, n. 8, p. 2535–2541. 2004.

CONTI, S.; MAGLIANI, W.; ARSENI, S.; DIECI, E.; FRAZZI, R.; SALATI, A.; VARALDO, P. E.; POLONELLI, L. In vitro Activity of Monoclonal and Recombinant Yeast Killer Toxin-like Antibodies against Antibiotic-resistant Gram-positive Cocci. **Mol. Med.**, Cambridge, v. 6, n. 7, p. 613–619. 2000.

CORTI, M.; PRIARONE, M.; NEGRONI, R.; GILARDI, L.; CASTRELO, J.; ARECHAYALA, A. I.; MESSINA, F.; FRANZE, O. Ventriculoperitoneal shunts for treating increased intracranial pressure in cryptococcal meningitis with or without ventriculomegaly. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 524–527. 2014.

DAMON, C.; BARROSO, G.; FÉRANDON, C.; RANGER, J.; FRAISSINET-TACHET, L.; MARMEISSE, R. Performance of the COX1 gene as a marker for the study of metabolically active Pezizomycotina and *Agaricomycetes* fungal communities from the analysis of soil RNA. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 693–705. 2010.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 5, n. 12, p. 939–591. 2007.

DRAENERT, R.; SEYBOLD, U.; GRÜTZNER, E.; BOGNER, J. R. Novel antibiotics: Are we still in the pre–post-antibiotic era? **Infection**, München, v. 43, n. 2, p. 145–151. 2015.

FATICHENTI, F.; BERGERE, J. L.; DEIANA, P.; FARRIS, G. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. Butyricum*. **J. Dairy Res.**, London, v. 50, n. 4, p. 449–457. 1983.

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

FUENTEFRIA, A. M.; FRANSKOVIKI, I.; MERCADO, L.; RAMOS, J. P.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by two killer yeast isolates from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **J Basic Microbiol.**, Berlin, v. 2, p. 87-93. 2006.

GOESER, L.; FAN, T.-J.; TCHAPTCHET, S.; STASULLI, N.; GOLDMAN, W. E.; SARTOR, R. B.; HANSEN, J. J. Small Heat-Shock Proteins, IbpAB, protect Non-Pathogenic *Escherichia coli* from Killing by Macrophage-Derived Reactive Oxygen Species. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-13. 2015

GOLUBEV, W. I.; CHURKINA, L. G. Specificity of sensitivity to mycocin from *Tilletiopsis flava* BKM Y-2838. **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 70, n. 1, p. 51–54. 2001.

GOLUBEV, W. I. **Antagonistic interactions among yeasts.** The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, Germany, p. 197-219, 2006.

GOLUBEV, W. I.; PFEIFFER, I.; GOLUBEVA, E. W. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 40, p. 151-157. 2002.

GONTIJO, F. A.; PASCON, R. C.; FERNANDES, L.; MACHADO, J.; ALSPAUGH, J. A.; VALLIM, M. A. The role of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 70, p. 12–23. 2014.

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

HAMDAN, H. Z.; KUBBARA, E.; ADAM, A. M.; HASSAN, O. S.; SULIMAN, S. O.; ADAM, I. Urinary tract infections and antimicrobial sensitivity among diabetic patients at Khartoum, Sudan. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, London, v. 14, p. 26. 2015.

HASAN, T.; CHOI, C. H.; OH, M. H. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. **Genomics Inform.**, Seoul, v. 13, n. 1, p. 2-6. 2015.

HODGSON, V. J.; BUTTON, D.; WALKER, G. M. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. **Microbiology**. v. 141, n. 8, p. 2003–2012. 1995.

HSU, L. Y.; HARRIS, S. R.; CHLEBOWICZ, M. A.; LINDSAY, J. A.; KOH, T. H.; KRISHNAN, P.; TAN, T. Y.; HON, P. Y.; GRUBB, W. B.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; HOLDEN, M. T. Evolutionary dynamics of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system. **Genome Biol.**, London, v. 16, n. 1, p. 81-94. 2015.

IANIRI, G.; IDNURM, A. Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. **MBio**, Washington, v. 6, n. 2, p. 1-18. 2015.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; YUCELIS, A. Identification and killer activity of yeasts contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. **Food Microbiology**, v.14, p.125-131. 1997.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; SERTKAYA, A. Enzymic Activity of the K5-Type Yeast Killer Toxin and Its Characterization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 69, n. 11, p. 2200–2206. 2005.

KANDEL, J. S.; STERN, T. A. Killer Phenomenon in Pathogenic Yeast. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 15, n. 4, p. 568–571. 1979.

KANT, R. Genome Sequences of Four *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis. **Genome Announc.**, Washington, v. 3, n. 2, p. 1-2. 2015.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 2, n. 2, p. 123–140. 2004.

KAVANAUGH, N. L.; ZHANG, A. Q.; NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D.; RIBBECK, K.. Mucins Suppress Virulence Traits of *Candida albicans*. **MBio**, v. 5, n. 6, p. 1–8. 2014.

KIM, H.; JUNG, K. W.; MAENG, S.; CHEN, Y. L.; SHIN, J.; SHIM, J. E.; HWANG, S.; JANBON, G.; KIM, T.; HEITMAN, J.; BAHN, Y. S.; LEE, I. Network-assisted genetic dissection of pathogenicity and drug resistance in the opportunistic human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Sci. Rep.**, London, v. 5, n. 5, p. 8767-8777. 2015.

KURNATOWSKA, A. K.; KWAŚNIEWSKA, J. Susceptibility to miconazole and itraconazole of *Candida* strains isolated from hospitalized and outpatient clinic patients. **Wiad. Parazytol.**, Warszawa, v. 55, n. 4, p. 415–423. 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomy Study. 5 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2011.

LABBANI, F. Z.; TURCHETTI, B.; BENNAMOUN, G.; DAKHMOUCHE, S.; ROBERTI, R.; CORAZZI, G.; MERAIHI, Z.; BUZZINI, P. A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 107, n. 4, p. 961–970. 2015.

LEHNERT, T.; TIMME, S.; POLLMÄCHER, J.; HÜNNIGER, K.; KURZAI, O.; FIGGE, M. T. Bottom-up modeling approach for the quantitative estimation of parameters in pathogen-host interactions. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 6, p. 1–15. 2015.

LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Curr. Med. Res. Opin.**, London, v. 25, n. 7, p. 1732–1740. 2009.

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

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World J. Clin. Cases**, Hong Kong, v. 2, n. 12, p. 787–814. 2014.

LOPES, M. R.; KLEIN, M. N.; FERRAZ, L. P.; SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Saccharomyces cerevisiae*: A novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 175, p. 93–99. 2015.

LOWES, K. F.; SHEARMAN, C. A.; PAYNE, J.; MCKENZIE, D.; ARCHER, D. B.; MERRY, R. J.; GASSON M. J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1066-1076. 2000.

LUO, S.; HIPLER, U. C.; MÜNZBERG, C.; SKERKA, C.; ZIPFEL, P. F. Sequence Variations and Protein Expression Levels of the Two Immune Evasion Proteins Gpm1 and Pra1 Influence Virulence of Clinical *Candida albicans* Isolates. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. 1-19. 2015.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, n. 3, p. 369–400. 1997.

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

MARGESIN, R.; MINERBI, S.; SCHINNER, F. Long-term monitoring of soil microbiological activities in two forest sites in South tyrol in the italian alps. **Microbes Environ.**, Tagajo, v. 29, n. 3, p. 277–285. 2014.

MASIH, E. I.; ALIE, I.; PAUL, B. Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 233–237. 2000.

MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam-New York v. 21, p. 166–178. 2014.

MEDEIROS, A. O.; MISSAGIA, B. S.; BRANDÃO, L. R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F. A. R.; ROSA, C. A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. **Brazilian J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 1582–1594. 2012.

- MIDDELBEEK, E. J.; HERMANS, J. M.; STUMM, C.; MUYTJENS, H. L. High incidence of sensitivity to yeast killer toxins among *Candida* and *Torulopsis* isolates of human origin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 17, n. 3, p. 350–354. 1980.
- MISHRA, N. N.; TULIKA, P.; NEERAJ, S.; ANURANG, P.; RAJENDRA, P.; DWIJENDRA, K. G.; RANDHIR, S. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, Budapest, v. 54, n. 3, p. 201–235. 2007.
- MORACE, G.; MANZARA, S.; DETTORI, G.; FANTI, F.; CONTI, S.; CAMPANI, L.; POLONELLI, L.; CHEZZI, C. Biotyping of bacterial isolates using the yeasts killer system. **Eur. J. Epidemiol.**, Rome, v. 5, n. 3, p. 303–310. 1989.
- MURPHY, C. R.; HUDSON, L. O.; SPRATT, B. G.; ELKINS, K.; TERPSTRA, L.; GOMBOSEV, A.; NGUYEN, C.; HANNAH, P.; ALEXANDER, R.; ENRIGHT, M. C.; HUANG, S. S. Predictors of Hospitals with Endemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 34, n. 06, p. 581–587. 2013.
- OLORODE, O. A.; OKPOKWASLI, G. C. The efficacy of disinfectants on abattoirs' *Candida albicans* isolates in Niger Delta region. **F1000Res.**, London, v. 1, n. 20, p. 1–8. 2012.
- ORSINI, J.; BLAAK, C.; MAHMOUD, D.; YOUNG-GWANG, J. Massive cerebral edema resulting in brain death as a complication of *Cryptococcus neoformans* meningitis. **J. community Hosp. Intern. Med. Perspect.**, Sweden, v. 5, n. 1, p. 1-4. 2015.
- OST, K. S.; O'MEARA, T. R.; HUDA, N.; ESHER, S. K.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. **PLOS Genet.**, San Francisco, v. 11, n. 4. 2015.
- PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiol.**, London, v. 47, p. 85–92. 2015.
- PASSOTH, V.; OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 99, n. 1, p. 121-125. 2011.
- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. A.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam-New York, v. 6, n. 1, p. 3-13. 2006.
- PFEIFFER, I.; GOLUBEV, W. I.; FARKAS, Z.; KUCSERA, J.; GOLUBEV, N. Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 86, n. 4, p. 369–375. 2004.

POGORZELSKA-MAZIARZ, M.; HERZIG, C. T. A.; LARSON, E. L.; FURUYA, E. Y.; PERENCEVICH, E. N.; STONE, P. W. Implementation of Antimicrobial Stewardship Policies in U.S. Hospitals: Findings from a National Survey. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 36, n. 3, p. 261–264. 2015.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 24, n. 5, p. 866–869. 1986.

POPOOLA, V. O.; BUDD, A.; WITTIG, S. M.; ROSS, T.; AUCOTT, S. W.; PERL, T. M.; CARROLL, K. C.; MILSTONE, A. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infections in a neonatal intensive care unit despite active surveillance cultures and decolonization: challenges for infection prevention. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 35, n. 4, p. 412–418. 2014.

PUCHKOV, E.; WIESE, A.; SEYDEL, U.; KULAKOVSKAYA, T. Cytoplasmic membrane of a sensitive yeast is a primary target for *Cryptococcus humicola* mycocidal compound (microcin). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1515, p. 239–250. 2001.

RINCÓN, S.; PANESSO, D.; DÍAZ, L.; CARVAJAL, L. P.; REYES, J.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era. **Biomedica**, Bogotá, v. 34 n. 1, p. 191–208. 2014.

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

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. **Yeast**, v. 21, p. 151–162. 2004.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; BARROSO, J.; PEINADO, J. M. (1,6)- β -D-glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 95–96, 2002.

SARDI, J. C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. M. J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 62, n. 1 p. 10–24. 2013.

SÉGUY, N.; POLONELLI, L.; DEI-CAS, E.; CAILLIEZ, J. C. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam-New York, v. 22, n. 1–2, p. 145–149. 1998.

SEIFI, Z.; MAHMOUDABADI, Z. A.; ZARRIN, M. Extracellular Enzymes and Susceptibility to Fluconazole in *Candida* Strains Isolated From Patients With Vaginitis and Healthy Individuals. **Jundishapur J. Microbiol.**, Avaz, v. 8, n. 3, p. 1–4. 2015.

SINGH, A.; VERMA, R.; MURARI, A.; AGRAWAL, A. Oral candidiasis: An overview. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Mumbai, v. 18, n. 4, p. 81–85. 2014.

ŠTURSOVÁ, M.; ZIFČÁKOVÁ, L.; LEIGH, M. B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 735–746. 2012.

SUN, L.; LIAO, K.; WANG, D. Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 2. 2015.

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

VIRAY, M. A.; MORLEY, J. C.; COOPERSMITH, C. M.; KOLLEF, M. H.; FRASER, V. J.; WARREN, D. K. Daily Bathing with Chlorhexidine-based Soap and the Prevention of *Staphylococcus aureus* Transmission and Infection. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 35, n. 3, p. 243–250. 2014.

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

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

WANG, L.; YUE, L.; CHI, Z.; WANG, X. Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. **Dis. Aquat. Organ.**, Oldendorf/Luhe, v. 80, n. 3, p. 211–218. 2008.

j
WANG, S.; BAO, Y.; MENG, Q.; XIA, Y.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; TANG, F.; ZHUGE, X.; YU, S.; HAN, X.; DAI, J.; LU, C. IbeR Facilitates Stress-Resistance, Invasion and Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3. 2015.

WANG, Y. C.; TSAI, I. C.; LIN, C.; HSIEH, W. P.; LAN, C. Y.; CHUANG, Y. J.; CHEN, B. S. Essential functional modules for pathogenic and defensive mechanisms in *Candida albicans* infections. **Biomed Res. Int.**, New York, v. 2014, p. 1–15. 2014.

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

5 CAPÍTULO 1

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos às micocinas de
Wickerhamomyces anomalus

Periódico: Yeast (B2)

Susceptibilidade de micro-organismos patogênicos às micocinas de

Wickerhamomyces anomalus

Ana Paula Paris¹ e Rinaldo Ferreira Gandra^{1*}

¹ Laboratório de Micologia, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Cascavel,
Paraná, Brasil

*Autor correspondente

Rinaldo Ferreira Gandra

Hospital Universitário do Oeste do Paraná

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Av. Tancredo Neves, 3224

Cascavel, Paraná, Brasil.

zip code: 85806-470

e-mail: rinaldo.gandra@unioeste.br.

phone number: 55-45-3321-540

Resumo

O significativo aumento da incidência e prevalência de resistência de micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos vem sendo um grande problema de saúde pública, tornando-se instigante a pesquisa de novos compostos terapêuticos contra essa ameaça. Micocinas produzidas por algumas leveduras, como *Wickerhamomyces anomalus* possuem atividade contra outros micro-organismos. O objetivo desse trabalho é verificar a ação antimicrobiana de micocinas presentes no sobrenadante de cultura de três cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) isolados do meio ambiente frente a leveduras e bactérias de importância médica. As bactérias foram *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* e as leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Foi realizada análise de toxicidade das micocinas em eritrócitos humanos. Todas as micocinas do sobrenadante foram capazes de inibir o crescimento das leveduras e das bactérias testadas. As micocinas presentes no sobrenadante de WA40, WA45 e WA92 apresentaram um amplo espectro de ação e baixo grau de hemólise.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, leveduras produtoras de micocinas, micro-organismos multirresistentes.

Introdução

As doenças infecciosas são a segunda mais importante causa de mortalidade no mundo e o expressivo aumento da resistência de micro-organismos patógenos aos antimicrobianos tornou-se um grande problema de saúde pública mundial [St. Denis *et al.*, 2011]. Essa frequência de resistência tem sido conferida, principalmente ao uso exacerbado e inadequado de drogas antimicrobianas [Conti *et al.*, 2000; Magliani *et al.*, 2004].

O desenvolvimento de micro-organismos resistentes tem chamado a atenção para a busca de antimicrobianos alternativos e em meio a novas moléculas pesquisadas estão as micocinas de leveduras *killer*, que apresentam grande potencial devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana com alta estabilidade em comparação a micocinas de outras leveduras [Izgü *et al.*, 2005; Tan e Tay, 2011].

Algumas leveduras são capazes de produzir micocinas ou toxinas *killer*, que são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas e que podem ser tóxicas a micro-organismos eucariotos ou procariotos sensíveis [Buzdar *et al.*, 2011]. As micocinas já foram relatadas em diferentes gêneros, como, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, [Comitini *et al.*, 2004; Buzzini *et al.*, 2007; De Ingeniis *et al.*, 2009; Robledo-Leal *et al.*, 2012].

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura pertencente a ordem *Saccharomycetales*, com capacidade de crescer em condições extremas de estresse ambiental e que se adapta facilmente a diferentes condições de crescimento [Fredlund *et al.*, 2002; Kurtzman *et al.*, 2011]. Tal característica justifica seu isolamento de diferentes habitats, como: solo, plantas, flores, cascas de frutas, alimentos, óleo contaminado, laticínios, águas residuais, tecidos humanos, ambientes marinhos e insetos [Walker *et al.*, 1995; Kurtzman *et al.*, 2011; Cappelli *et al.*, 2014). Neste estudo, buscou-se determinar os efeitos inibitórios de micocinas produzidas por cepas de *W. anomalus* isoladas do meio ambiente frente a micro-organismos de importância clínica: *A. baumannii*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*.

Materiais e Métodos

Isolamento de leveduras do solo

Foram coletadas 200 amostras de solo nas margens do Lago de Itaipu – Paraná, Brasil, as quais, foram armazenadas em bolsas herméticas vedadas e acondicionadas sob baixa temperatura em caixa de isopor. Inicialmente, o solo foi homogeneizado e 50 g foram adicionados em 250 mL de solução salina 0,9% contendo cloranfenicol 0,1% e cicloheximide 0,05%, e permaneceram sob agitação a 150 rpm, 25 °C durante 2 h. A suspensão foi diluída seriadamente até obter as concentrações 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} UFC.mL⁻¹, em seguida, foram plaqueadas em tripliacatas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 25 °C durante 72 h. Após esse período, foi realizado o reisolamento, em ágar Sabouraud, de colônias com características micromorfológicas compatíveis a leveduras. Desta forma, foi possível o reisolamento de 74 cepas de leveduras selvagens.

Triagem das leveduras produtoras de micocinas

Para verificar a produção de micocinas das 74 leveduras selvagens isoladas do solo elas foram testadas frente a 04 cepas de *C. albicans*, também, isoladas do solo. As leveduras selvagens foram mantidas a 25 °C por 48 h em ágar modificado (ágar 2%, peptona 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio dibásico 3,48%, pH 4,7) antes da realização do teste. Para cada cepa de *C. albicans* foi preparada uma suspensão em salina contendo 10^5 UFC.mL⁻¹. Em seguida, essa suspensão foi misturada em placa de Petri ao ágar modificado com azul de metileno (ágar 2%, peptona 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92%, fosfato de potássio dibásico 3,48% e azul de metileno 0,003%, pH 4,7) a uma temperatura de aproximadamente 55 °C, após homogeneização e solidificação as leveduras selvagens foram inoculadas em pontos equidistantes e incubadas a 25 °C por 72 h. As leveduras selvagens foram consideradas produtoras de micocinas quando produziram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis ao seu redor, demonstrando que as cepas de *C. albicans* foram sensíveis. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Entre as leveduras selvagens três produziram micocinas com atividade frente as 04 cepas de *C. albicans* testadas. Sendo escolhidas para a completa identificação e demais testes.

Identificação leveduras produtoras de micocinas

A identificação molecular foi realizada com o DNA genômico das 03 leveduras selvagens, os quais foram amplificados na região ITS, que compreende os espaçadores intergênicos ITS1 (18S rRNA) e ITS2 (5.8S rRNA) foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Os produtos das ampliações foram sequenciados e as respectivas sequências foram analisadas no programa BLAST, comparando-as com as sequências depositadas no GenBank. As 03 leveduras selvagens produtoras de micocinas apresentaram 98, 99, 99% de similaridade com *Wickerhamomyces anomalus* e cujas respectivas sequências foram depositadas no GenBank. Dessa forma, o número de acesso para as sequências de nucleotídeos de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 são KT580792, KT580794 e KT580796 respectivamente. Disponíveis no site .

Micro-organismos patogênicos

Os isolados de leveduras patogênicas utilizadas no estudo foram: 02 *Candida albicans* (isoladas de sangue), 02 *Candida glabrata* (isoladas de sangue), 02 *Candida guilliermondii* (isoladas de sangue), 01 *Candida tropicalis* (isolada de sangue) e 02 *Cryptococcus neoformans* (isolados de líquido). As bactérias foram: 01 *Escherichia coli*, 01 *Acinetobacter baumannii* multirresistente (isolada de sangue) e 01 *Staphylococcus aureus* (isolado de sangue). As leveduras e as bactérias foram mantidas em ágar Sabouraud e Muller Hinton, respectivamente.

Obtenção de micocinas do sobrenadante a partir de cultivo de W. anomalus

As cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA95 foram mantidas previamente a 25 °C em meio AM. Suspensões de 10^6 UFC.mL⁻¹ foram obtidas dos isolados das culturas das cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) e transferidas para os respectivos frascos contendo 200 mL de caldo modificado (peptona bacteriológica 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio bibásico 3,48%, pH 4,7) e incubadas a 25 °C por 5 dias em cultivo estático. Em seguida, os cultivos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 min. Obtendo-se as micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 provenientes dos sobrenadantes de cultura das cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92, respectivamente. As micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foram esterilizadas por filtração através de membrana 0,22 µm e mantidas a 4 °C até realização dos testes *in vitro*.

Atividade antimicrobiana

A susceptibilidade dos micro-organismos *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* frente as micocinas de *W. anomalus* WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foi testada pela técnica de microdiluição em caldo, descrita pela Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI, 2008], método M27-A3 com algumas modificações. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços. As micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foram testadas nas diluições finais de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 e colocadas nos respectivos poços em volumes de 100 µL, do menos diluído para o mais diluído. Suspensões de células de cada micro-organismo testado foram ajustadas para concentrações finais de 10^3 UFC.mL⁻¹ em caldo Mueller Hinton e, em seguida, 100 µL foram inoculados nos respectivos poços. Foi realizado controle de crescimento com meio estéril e inóculo de cada micro-organismo e o controle de esterilidade contendo apenas o meio estéril. As placas de microdiluição foram incubadas a 35° C e após 48 h foi observada presença ou ausência de crescimento visível tendo como referência o controle de crescimento. Também, alíquotas de 10 µL, dos poços onde não houve turvação, foram semeadas em ágar nutriente para confirmar o não crescimento dos respectivos micro-organismos. O teste foi realizado em triplicata.

Ação Citotóxica

A determinação do efeito citotóxico das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foi realizado seguindo o método de Latoud *et al.* [1986], com algumas modificações. Eritrócitos humanos, coletado de indivíduo saudável, foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Em tubos contendo 500 µL de eritrócitos humanos a 4% foram adicionados 10, 50, 100, 200 e 400 µL de cada micocina e completou-se para volume final de 1 mL com PBS. A partir da anfotericina B na concentração de 5 mg mL⁻¹ alíquotas de 10, 50, 100, 200 e 400 µL foram adicionados em tubos contendo 500 µL de eritrócitos humanos a 4% e adicionou-se PBS até volume final de 1 mL. Em seguida, as suspensões de eritrócitos a 2% com as micocinas e com a anfotericina B foram incubadas a 37 °C por 1 h. Depois da incubação, as células foram sedimentadas a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e a absorbância foi determinada, usando espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. O controle negativo foi constituído de suspensão de eritrócitos e tampão PBS, enquanto, o controle positivo constituiu de tampão de lise (ácido acético 2%) para lisar completamente os eritrócitos. A percentagem de hemólise foi calculada e representada graficamente contra os volumes das micocinas e da anfotericina B utilizadas para determinar os efeitos citotóxicos de dose para eritrócitos humanos. O teste foi realizado em triplicata. A percentagem de eritrócitos intactos e o percentual de hemólise foram calculados, usando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ eritrócitos intactos} = 1 - \left(\frac{A_{\text{sobrenadante das micocinas}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{do tampão de lise}} - A_{\text{PBS}}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ de hemólise} = 100 - (\% \text{ de eritrócitos intactos})$$

Resultados e Discussão

Com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o aumento de novos micro-organismos multirresistentes no mundo, faz-se, cada vez mais, necessária à busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana e com menos toxicidade para o ser humano [Singh *et al.*, 2014].

No presente estudo, a atividade antimicrobiana das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 presentes no sobrenadante das culturas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92, isoladas do solo, foram examinadas por microdiluição em caldo. Essas micocinas demonstraram atividade frente às bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *A. baumannii* (Tabela 1). A atividade inibitória das micocinas frente à *A. baumannii* multirresistente foi de grande destaque em vista que as micocinas WA40M1 e WA45M2 inibiram a bactéria até a diluição de 1/16 e que a micocina WA92M3 a inibiu em todas as diluições testadas (Tabela 1). Ao nosso conhecimento, até o momento não há relatos da atividade de *W. anomalus* frente à *A. baumannii*. A ação de micocinas frente às bactérias foi verificado por Polonelli e Morace [1986] que demonstraram a atividade direta de cepas de *Hansenula anomala* produtoras de micocinas, também isoladas do solo, frente à *E. coli* e *S. aureus*. Fato verificado também por Muccilli *et al.* [2013], que cepas de *W. anomalus* isoladas da salmoura da azeitona foram capazes de inibir o crescimento de *Enterobacter aerogenes* e *S. aureus*.

Hodgson *et al.* [1995] observaram a ação direta de micocinas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* e *Williopsis mrakii* frente às cepas clinicamente importantes de *Candida*. Nesse trabalho, leveduras patogênicas do gênero *Candida* e *Cryptococcus* demonstraram susceptibilidade às micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* presentes no sobrenadante. Destacando-se a inibição da cepa de *C. neoformans* 917 com todas as diluições da micocina WA45M2, assim como, *C. albicans* 311 e *C. glabrata* 878 que foram inibidas com todas as diluições das micocina WA40M1 e WA45M2 de *W. anomalus* (Tabela 1).

O teste de atividade antimicrobiana das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* também foi avaliado com a mistura das três micocinas. Contudo, não houve uma potencialização no efeito inibitório frente a nenhum dos micro-organismos testados (dados não mostrados).

As interações que há entre as leveduras produtoras de micocinas e outros micro-organismos ainda não estão completamente esclarecidas. Entretanto, particularidades na composição da parede celular dessas leveduras torna aceitável que a secreção de micocinas seja o mecanismo de inibição mais provável [Buzzini *et al.*, 2007]. Tal ação ocorre por meio de efeitos letais após a ligação da micocina a receptores específicos na parede celular e na membrana plasmática, causando o aumento da permeabilidade da membrana plasmática levando ao extravasamento de íons de K^+ , ATP e metabólitos; inibição da síntese de DNA, β -1,3-glucano, quitina, glicanas e manoses; interrupção da fase G1 do ciclo celular [Santos *et al.*, 2002; Santos e Marquina, 2004; Golubev, 2006; Lima *et al.*, 2013].

Embora as glicoproteínas sejam o principal mecanismo de *W. anomalous* inibir o crescimento de outros micro-organismos, a síntese por essa levedura de compostos como, acetato de etila, acetato de isoamila e propionato de etila também podem ser responsáveis por causar essa inibição [Walker *et al.*, 1995; Passoth *et al.*, 2011]. Os pesquisadores Izgü e Altinbay [2004] descreveram que uma *exo*- β -1,3-glucanase de *W. anomalous* pode ter uma ação direta na parede celular de alguns fungos.

As micocinas produzidas por leveduras são consideradas proteínas grandes para serem utilizadas na terapia antifúngica sistêmica sem que ocorra a indução da resposta imune, mas podem ser utilizadas na criação de derivados sintéticos para essa finalidade [Magliani *et al.*, 1997]. No desenvolvimento de novos antimicrobianos se faz importante a busca por substâncias que não apresentem toxicidade ao ser humano. Nesse trabalho, foi realizado um ensaio hemolítico utilizando eritrócitos humanos para avaliar o efeito citotóxico das micocinas dos sobrenadantes das cepas de *W. anomalous* WA40, WA45 e WA92. As micocinas não apresentaram toxicidade, a percentagem de hemólise variou de 0,82% a 8,40% dependendo do volume e da micocina testada. Enquanto, a anfotericina B teve um percentual muito mais elevado, apresentando uma atividade hemolítica de 100% a partir do volume de 100 μ L (Figura 1). Em teste realizado por Bhattacharyya *et al.* [2013] com células humanas, micocinas com atividade antifúngica produzidas por *Aspergillus flavus* não apresentaram ação tóxica em células do epitélio de laringe humana (Hep-2).

Conclusão

As micocinas presentes no sobrenadante das cepas de *W. anomalus* ambientais apresentaram efeito inibitório frente às bactérias e leveduras de importância médica, assim como, não apresentaram uma toxicidade em eritrócitos humanos até 400uL sugerindo ser um promissor agente no desenvolvimento de uma nova terapêutica contra as bactérias *A. baumannii*, *E. coli*, *S. aureus* e as leveduras *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*.

Agradecimentos

Apoio da Fundação Araucária, PR, BR.

Referências

- Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Jain A, Singh M. 2013. In-vitro Inhibition of Biofilm Formation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Heat Stable Compounds in Culture Filtrate of *Aspergillus flavus*. *J. Clin. Diagn. Res.*, **7**: 2167–2169.
- Buzdar MA, Chi Z, Wang Q, Hua MX, Chi ZM. 2011. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**: 1571–1579.
- Buzzini P, Turchetti B, Vaughan-Martini AE. 2007. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: The state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res.*, **7**: 749–760.
- Cappelli A *et al.* 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, **9**.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Comitini F, Di Pietro N, Zacchi L, Mannazzu I, Ciani M. 2004. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: Purification and characterization. *Microbiology*, **150**: 2535–2541.

- Conti S, Magliani W, Arseni S, Dieci E, Frazzi R, Salati A, Varaldo PE, Polonelli L. 2000. In vitro activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Med.*, **6**: 613–619.
- St. Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP. 2011. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence*, **2**: 509–520.
- Fredlund E, Druvefors U, Boysen ME, Lingsten KJ, Schnürer J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Res.*, **2**: 395–402.
- Golubev WI. 2006. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Péter G, Rosa C. (eds). Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg; 197-219.
- Hodgson VJ, Button D, Walker GM. 1995. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, **141**: 2003–2012.
- De Ingeniis J, Raffaelli N, Ciani M, Mannazzu I. 2009. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 1129–1134.
- Izgü F, Altinbay D. 2004. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**: 685–693.
- Izgü F, Altinbay D, Sertkaya A. 2005. Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**: 2200–2206.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (eds). 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Science: Amsterdam.
- Latoud C, Peypoux F, Michel G, Genet R, Morgat JL. 1986. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.*, **856**: 526–535.
- Lima JR, Gondim DMF, Oliveira JTA, Oliveira FSA, Gonçalves LRB, Viana FMP. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.*, **83**: 58–64.
- Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**: 369–400.
- Magliani W, Conti S, Salati A, Vaccari S, Ravanetti L, Maffei DL, Polonelli L. 2004. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Res.*, **5**: 11–18.
- Muccilli S, Wemhoff S, Restuccia C, Meinhardt F. 2013. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast*, **30**: 33–43.

Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J. 2011. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **99**: 121–125.

Polonelli L, Morace G. 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 866–869.

Robledo-Leal E, Villarreal-Treviño L, González GM. 2012. Occurrence of killer yeasts in isolates of clinical origin. *Trop. Biomed.*, **29**: 297–300.

Santos A, Marquina D. 2004. Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, **21**: 151–162.

Santos A, Marquina D, Barroso J, Peinado JM. 2002. (1→6)-Beta-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**: 95–99.

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. 2014. Oral candidiasis: An overview. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, **18**: 81–85.

Tan HW, Tay ST. 2011. Anti-Candida activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts. *Trop. Biomed.*, **28**: 175–180.

Walker GM, McLeod AH, Hodgson VJ. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **127**: 213–222.

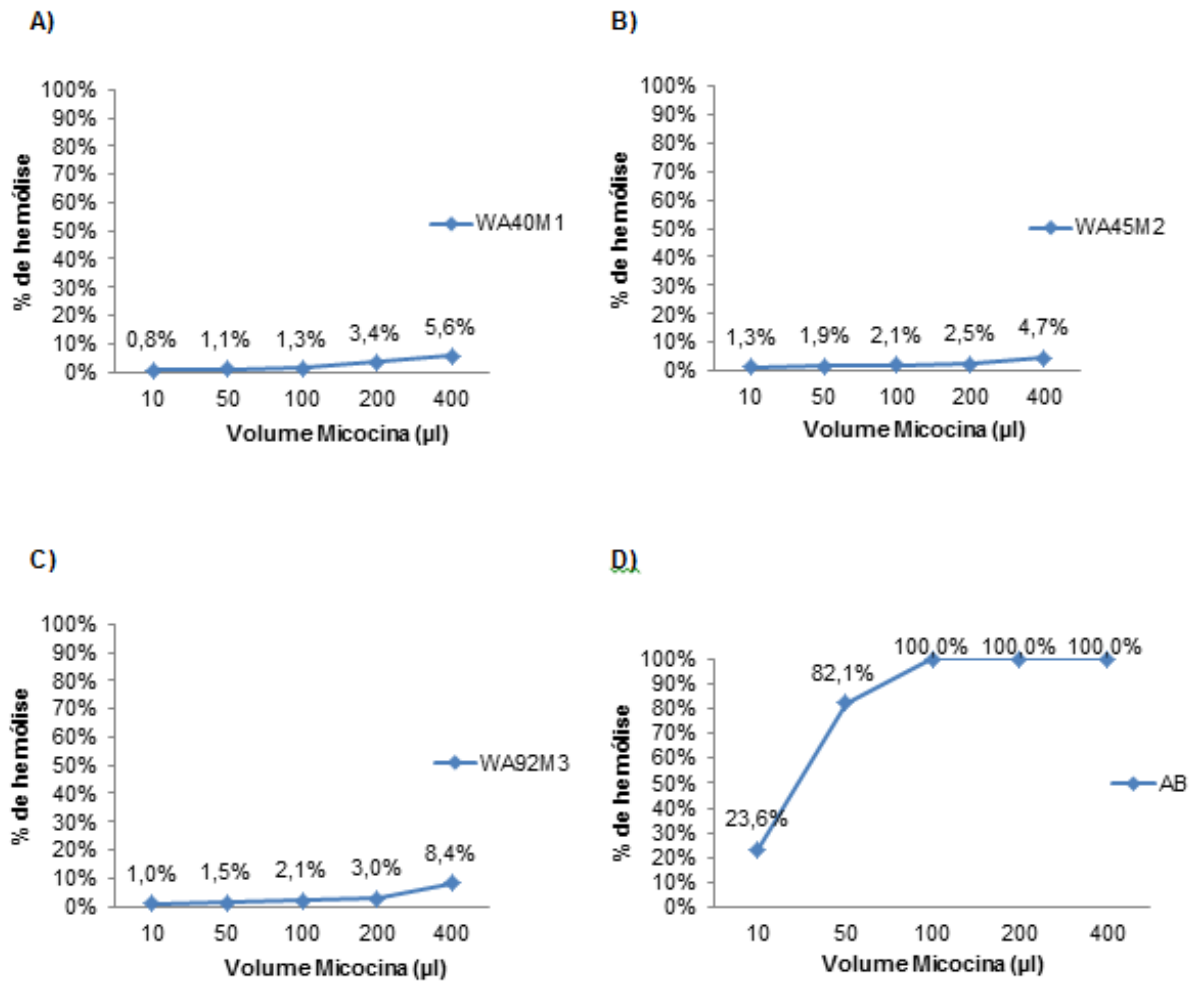
Tabela 1 Ação inibitória das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 presentes nos sobrenadantes das culturas de três cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) isoladas do ambiente frente a micro-organismos patogênicos.

AÇÃO DAS MICOCINAS DE <i>W. anomalus</i> FRENTE A MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS															
Micro-organismos patogênicos	Micocinas (diluições)														
	WA40M1					WA45M2					WA92M3				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> 311	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> 910	+	+	+	+		+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> 851	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> 878	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. guilliermondii</i> 839	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> 926	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> 925	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i> 678	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. neoformans</i> 917	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ (não houve turvação ou precipitado) - (houve turvação ou precipitado)

Legenda da Figura

Figura 1 Ação citotóxica das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 comparadas com anfotericina B. A) Percentual de hemólise da micocina WA40M1. B) Percentual de hemólise da micocina WA45M2. C) Percentual de hemólise da micocina WA92M3. D) Percentual de hemólise da anfotericina B (AB) (10 μL = 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 μL = 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 100 μL = 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 200 μL = 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 400 μL = 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Paris *et al.* Figura 1.

CAPÍTULO 2

Susceptibilidade de *Candida albicans* isolados de sangue frente às micocinas extraídas da parede celular de *Wickerhamomyces anomalus*

Periódico: PLOS ONE (A2)

Susceptibilidade de *Candida albicans* isolados de sangue frente às micocinas
extraídas da parede celular de *Wickerhamomyces anomalus*

Ana Paula Paris¹, Rinaldo Ferreira Gandra^{1*}

¹ Laboratório de Micologia, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Cascavel,
Paraná, Brasil

*Autor correspondente

e-mail: (RFG)

Título curto: *Candida albicans* e micocinas *Wickerhamomyces anomalus*

Resumo

A ocorrência de infecções causadas por *Candida albicans* em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, assim como, a resistência desses aos antifúngicos disponíveis vem sendo um importante problema de saúde mundial. Na busca por novas moléculas pesquisadas estão as micocinas secretadas por leveduras, com destaque as micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* que apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana. O objetivo do trabalho é avaliar a atividade de micocinas obtidas da parede celular de *W. anomalus* ambientais frente a cepas de *C. albicans* isoladas de sangue. As micocinas foram extraídas da parede celular de três cepas de *W. anomalus* (WA40, WA45 e WA92) e trinta cepas de *C. albicans* isoladas de sangue foram avaliadas, em microdiluição em caldo, quanto a susceptibilidade a essas micocinas. A concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 apresentaram atividade, respectivamente, em 96,6, 96,6 e 90,0% das cepas de *C. albicans*. Os extratos das micocinas WA45M2 e WA92M3 apresentaram atividade em 3,3% das cepas de *C. albicans* na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As micocinas extraídas da parede celular das cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 apresentaram atividade antifúngica frente à *C. albicans* e baixo grau de hemólise.

Introdução

O fungo *Candida albicans* faz parte da microbiota do homem, estando presente nas mucosas do trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis, podendo ocasionar infecções potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos, devido a fatores como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), transplante de órgãos e tratamento quimioterápico do câncer. Além disso, *C. albicans* está entre as principais causadoras de infecções nosocomial, sendo a espécie mais prevalente e patogênica do gênero *Candida* [1–3].

As infecções fúngicas invasivas são de grande importância em pacientes com a imunidade debilitada, entretanto, os antifúngicos disponíveis estão limitados devido à resistência desses fungos aos mesmos [4]. Sendo assim, pesquisadores buscam por novas substâncias com ação frente a micro-organismos multirresistentes e com menos toxicidade para o ser humano. E em meio a novas moléculas pesquisadas estão as micocinas secretadas por leveduras, que são candidatas em potencial devido ao seu amplo espectro de ação [5].

Algumas leveduras são capazes de produzir micocinas, que são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas que inibem o crescimento de outros micro-organismos eucariotos ou procariotos sem interferir no seu próprio crescimento [6]. Esse fenômeno de inibição foi descoberto por Bevan e Makower [7] em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, desde então, diversos gêneros como *Wickerhamomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis* e *Williopsis* foram relatados por demonstrarem essa ação inibitória frente a outros micro-organismos [8–13].

Wickerhamomyces anomalus pode ser isolada de diferentes habitats como solo, plantas, flores, cascas de frutas, alimentos, óleo contaminado, laticínios, águas residuais, tecidos humanos, ambientes marinhos e insetos [14–16]. As micocinas produzidas por essa levedura apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana, com alta estabilidade em comparação as micocinas de outras leveduras, e assim, sendo de grande destaque pelo seu potencial na saúde e na biotecnologia [17,18]. No presente estudo, relatamos a atividade das micocinas presentes na parede celular de *W. anomalus* ambientais frente a cepas de *C. albicans* isoladas de sangue.

Materiais e métodos

Micro-organismos

Neste estudo foram utilizados 30 isolados de *C. albicans* de amostras de sangue de pacientes internados no Hospital Universitário do Oeste do Paraná. As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud. Foram utilizadas três cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 identificadas molecularmente cuja sequências foram depositadas no GenBank e os números de acessos são KT580792, KT580794 e KT580796 respectivamente. Disponíveis no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Obtenção dos extratos das micocinas

Os extratos de micocinas foram obtidos da parede celular a partir do cultivo das cepas ambientais de *W. anomalous* WA40, WA45 e WA95. As cepas de *W. anomalous* foram mantidas previamente a 25 °C em meio ágar modificado (ágar 2%, peptona 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio dibásico 3,48%, pH 4,7). Suspensões de 10^6 UFC.mL⁻¹ foram obtidas dos isolados das culturas das cepas de *W. anomalous* (WA40, WA45 e WA92) e transferidas para os respectivos frascos contendo 200 mL de caldo modificado (peptona bacteriológica 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio bibásico 3,48%, pH 4,7) e incubadas a 25 °C por 5 dias em cultivo estático. Após, os cultivos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 min e os precipitados das células de *W. anomalous* WA40, WA45 e WA92 foram lavados três vezes com água destilada estéril e secos em estufa a 40 °C. As células secas foram misturadas com o líquido extrator de Coca (0,033 M bicarbonato de sódio, 0,085 M cloreto de sódio, pH 9,1) 5% (m/v) e mantidas a 4 °C por uma semana. Em seguida, foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. Obtendo-se os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 provenientes da parede celular das cepas de *W. anomalous* WA40, WA45 e WA92 respectivamente. Os extratos das micocinas foram esterilizados por filtração através de membrana 0,22 µm e mantidos a 4 °C até realização dos testes *in vitro*.

Análises bioquímicas dos extratos de micocinas

As concentrações de proteínas e de carboidratos presentes nos extratos das micocinas da parede celular de *W. anomalous* WA40, WA45 e WA92 foram determinadas utilizando o método de Bradford [19] e o método de antrona [20], respectivamente.

Atividade antimicrobiana dos extratos de micocinas

A susceptibilidade de 30 cepas de *C. albicans* frente aos extratos das micocinas de *W. anomalous* WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foi testada pela técnica de microdiluição em caldo, descrita pela Clinical and Laboratory Standards Institute [21],

método M27-A3 com algumas modificações. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços. As concentrações dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 foram baseadas a partir das concentrações de proteínas presentes nos mesmos, desta forma, foram testados nas concentrações finais de 10, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e colocadas nos respectivos poços em volumes de 100 μL , do menos concentrado para o mais concentrado. Suspensões de células de cada cepa de *C. albicans* foram ajustadas para concentrações finais de 10^3 UFC.mL⁻¹ em caldo Mueller Hinton e, em seguida, 100 μL foram inoculados nos respectivos poços. Foi realizado controle de crescimento com meio estéril e inóculo de cada cepa de *C. albicans* e o controle de esterilidade contendo apenas o meio estéril. As placas de microdiluição foram incubadas a 35° C e após 48 h foi observada presença ou ausência de crescimento visível tendo como referência o controle de crescimento. Também, alíquotas de 10 μL , dos poços onde não houve turvação, foram semeadas em ágar nutriente para confirmar o não crescimento das respectivas cepas de *C. albicans*. O teste foi realizado em triplicata.

Determinação da Viabilidade

A viabilidade de *C. albicans* frente aos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 foi determinada usando o teste de viabilidade pelo método de fluorescência com diacetato de fluoresceína-brometo de etídio descrito por Calich *et al.* [22] com algumas modificações. Alíquotas de 200 μL de cada extrato das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* foram ajustadas para a concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram misturadas a igual volume de suspensão contendo 10^6 UFC.mL⁻¹ de *C. albicans*. Desta forma, para cada extrato das micocinas foram realizados oito ensaios, um para cada tempo de incubação (30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h), a 37 °C e para cada tempo de incubação foi realizado um controle constituído somente da suspensão da levedura e água estéril. Decorrido o tempo, alíquotas de 300 μL foram retiradas e misturadas a igual volume de uma solução de diacetato de fluoresceína (0,005%) e de brometo de etídio (0,005%) e incubadas por 15 min à 25 °C. Após, uma gota da mistura foi colocada sobre uma lâmina, coberta com uma lamínula e examinada em microscópio de imunofluorescência. Em seguida, 100 células foram

contadas e a percentagem de células mortas (células vermelhas) foi avaliada. O teste foi realizado em triplicata.

Ação Hemolítica

A determinação do efeito citotóxico dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 foi realizado seguindo o método de Latoud [23] com algumas modificações. Eritrócitos humanos, coletado de indivíduo saudável, foi lavado três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Uma suspensão de eritrócitos 2% foi incubado à 37 °C por 1 h com os extratos das micocinas nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 400 µg.mL⁻¹. Um teste paralelo foi realizado com a anfotericina B nas mesmas concentrações. Em seguida, as células foram sedimentadas a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e a absorbância foi determinada usando espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. O controle negativo foi constituído da suspensão de eritrócitos e do tampão PBS e o controle positivo foi constituído de tampão de lise (ácido acético 2%) para lisar completamente os eritrócitos. As percentagens de hemólise foram calculadas e representadas graficamente contra as concentrações de proteínas utilizadas para determinar os efeitos citotóxicos de dose para eritrócitos humanos. O teste foi realizado em triplicata. A percentagem de eritrócitos intactos e o percentual de hemólise foram calculados usando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ eritrócitos intactos} = 1 - \left(\frac{A \text{ do extrato das micocinas} - A \text{ PBS}}{A \text{ do tampão de lise} - A \text{ do PBS}} \right) \times 100 \quad 1$$

$$\% \text{ de hemólise} = 100 - (\% \text{ de eritrócitos intactos}) \quad 2$$

Resultados

Análises bioquímicas dos extratos de micocinas da parede celular

A dosagem de proteínas dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* foram, respectivamente, 9,643, 6,308 e 4,107 mg mL⁻¹. Enquanto que a concentração de carboidratos foi de, respectivamente, 1,678, 0,766 e 0,842 mg mL⁻¹ (Fig 1).

Fig 1 Análise bioquímica da concentração de proteínas e carboidratos presentes nos extratos de micocinas da parede celular das cepas WA40, WA45 e WA92 de *W.anomalus*.

Atividade antimicrobiana dos extratos de micocinas

A concentração de 400 µg.mL⁻¹ dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* apresentaram atividade, respectivamente, em 96,6, 96,6 e 90,0% das cepas de *C. albicans*. Na concentração de 200 µg.mL⁻¹ o maior percentual de cepas susceptíveis foi de 70,0% do extrato da micocina WA45M2. Enquanto que na concentração de 50 µg.mL⁻¹ os extratos das micocinas de WA45M2 e WA92M3 apresentaram 3,3% de cepas de *C. albicans* susceptíveis. Já na concentração de 10 µg.mL⁻¹ nenhum extrato das micocinas foi capaz de inibir as cepas de *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 1 Percentual de susceptibilidade de 30 cepas de *C. albicans* isoladas de sangue frente a diferentes concentrações dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92.

Percentual de cepas de <i>C. albicans</i> susceptíveis (%)					
Extratos das micocinas de <i>W. anomalus</i>	Concentrações extratos das micocinas (µg.mL ⁻¹)				
	400	200	100	50	10
WA40M1	96,6	46,6	6,6	0	0
WA45M2	96,6	70,0	16,6	3,3	0
WA92M3	90,0	16,6	6,6	3,3	0

Determinação da Viabilidade

A viabilidade celular de *C. albicans* na presença dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* está apresentada na Fig 2. A partir de 30 min de contato dos extratos de micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* com a levedura foram encontrados, respectivamente 26, 37 e 38% de células inviáveis. Em 12 h de contato 100% das células de *C. albicans* foram inviáveis.

Fig 2 Viabilidade de *C. albicans* após contato com os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ação Hemolítica

O efeito citotóxico dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 em eritrócitos humanos revelaram uma atividade hemolítica muito fraca até a concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que, a maior percentagem de hemólise foi de 5,2% com 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato da micocina WA40M1 de *W. anomalus*. Enquanto que, a anfotericina B apresentou uma atividade hemolítica de 100% a partir da concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig 3).

Fig 3 Ação citotóxica dos extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 obtidas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 comparadas com anfotericina B. A) Percentual de hemólise do extrato de micocina WA40M1. B) Percentual de hemólise do extrato de micocina WA45M2. C) Percentual de hemólise do extrato de micocina WA92M3. D) Percentual de hemólise da anfotericina B (AB).

Discussão

A descoberta de novas substâncias com atividade antifúngica é de fundamental importância, visto a ocorrência de infecções causadas por *C. albicans* em países

desenvolvidos e subdesenvolvidos e as limitações de eficácia e efeitos secundários graves das drogas antifúngicas disponíveis [24].

Os carboidratos e as proteínas são necessários para a formação da parede celular das leveduras. Algumas proteínas são enzimas que modificam a estrutura da parede ou que digerem nutrientes extracelulares e têm as glicoproteínas que fazem parte dos mecanismos de reconhecimento da célula. A parede celular dos ascomicetos, como *W. anomalus*, é formada principalmente por (1-3)/(1-6) β glucanoquitina, (1-3) α -glucano e de glicoproteínas [25].

Neste trabalho, foi possível dosar a quantidade de carboidratos e proteínas do extrato de micocinas da parede celular de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92, demonstrando a eficácia do líquido de Coca como líquido extrator. Segundo Mendes [26], quando as células fúngicas ficam em contato com o líquido de Coca por uma semana em uma temperatura de 4 °C a extração dos componentes da parede celular é otimizada. Além de não favorecer a hidrólise de glicoproteínas. Dessa forma foi possível manter o potencial antimicrobiano dos extratos das micocinas.

As 30 cepas de *C. albicans* clínicas, isoladas de sangue, utilizadas nesse estudo, foram inibidas por um ou por todos os extratos das micocinas da parede celular dos isolados ambientais de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92. Sendo que, os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* na concentração de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram os que melhor apresentaram atividade antifúngica, inibindo mais de 90% das cepas *C. albicans*. Sawant *et al.* [27] verificaram que a micocina produzida por uma cepa de *Pichia anomala* apresentou uma ação fungistática frente à *C. albicans*. Entretanto, uma micocina obtida do sobrenadante da cultura de *W. anomalus* isolada do meio ambiente não foi ativa contra *C. albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, mas sim, contra uma cepa clínica de *Candida mesorugosa* [28]. A heterogeneidade na resposta frente aos extratos das micocinas também foi verificada neste estudo, onde observou-se diferenças de respostas nas 30 cepas de *C. albicans*.

A capacidade de *W. anomalus* de inibir o crescimento de outros micro-organismos ocorre, supostamente, pela síntese de compostos voláteis (acetato de etilo, acetato de isoamilo e propionato de etilo) e pela produção e excreção de glicoproteínas (micocinas) [16,29]. E nos últimos anos a pesquisa em busca de micocinas com

atividade antimicrobiana vem tendo grande ênfase. Entretanto, a atividade antimicrobiana de produtos secretados por leveduras não é algo tão comum e também não se está bem esclarecido as interações entre as leveduras produtoras de micocinas e cepas de outros micro-organismos [30]. Contudo, algumas particularidades na composição da parede celular dessas leveduras torna aceitável que a secreção de micocinas seja o mecanismo de inibição mais provável [9].

Neste estudo, foram utilizados ensaios que proporcionaram a extração de glicoproteínas da parede celular das cepas WA40, WA45 e WA92 de *W. anomalus*, onde foi verificado que, de fato, essas micocinas presentes na parede celular apresentam ação antimicrobiana. O teste de atividade antimicrobiana também foi realizado com as micocinas do sobrenadante da cultura de WA40, WA45 e WA92, contudo, os resultados obtidos foram inferiores as micocinas da parede celular (dados não mostrados).

Pode-se observar que os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* foram capazes de inviabilizar as células de *C. albicans* pelo método de viabilidade utilizando diacetato de fluoresceína e brometo de etídio. Calich *et al.* [30] aplicaram esse método a diversas espécies de fungos tendo como base a capacidade das células fúngicas acumularem a fluoresceína (fluocromasia), sendo facilmente visualizada com a cor verde ao microscópio de imunofluorescência. Enquanto, o brometo de etídio penetra rapidamente nas células danificadas, ligando-se ao DNA e resultando em um complexo fluorescente de cor vermelha [32]. Sendo este, um método que apresenta como vantagens a rapidez, alta sensibilidade, simplicidade e boa reprodutibilidade, devido à nítida diferença entre as células viáveis e não viáveis [33].

Bhattacharyya *et al.* [34] observaram que compostos presentes no filtrado de cultura de *Aspergillus flavus* demonstraram capacidade de inibir *C. albicans* e foram considerados não tóxicos para células humanas. No presente estudo, os resultados do experimento de toxicidade em eritrócitos humanos foi de grande interesse, uma vez que os extratos das micocinas não apresentaram toxicidade, tendo um percentual máximo de hemólise de 5,2%. Enquanto, a anfotericina B apresentou um percentual muito mais elevado que os extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 de *W. anomalus* em todas as concentrações testadas (Fig 3). Entretanto,

algumas substâncias com atividade antimicrobiana provenientes de microorganismos podem apresentar toxicidade. Fato esse, mostrado por Sorensen *et al.* [35] que verificaram uma ação citotóxica de peptídeos, com atividade antifúngica, produzidos pela bactéria *Pseudomonas syringae* maior do que da anfotericina B quando testados em eritrócitos de ovelhas.

A anfotericina B é um antifúngico que, além de apresentar importantes efeitos colaterais como nefrotoxicidade, algumas espécies de *Candida* já estão se mostrando resistentes a ele [36]. Sendo assim, com o aumento da incidência de infecções causadas por *C. albicans* em pacientes debilitados e a alta resistência aos tratamentos antifúngicos disponíveis, há uma necessidade na descoberta e desenvolvimento de novos antifúngicos [37].

Nesse estudo podemos observar que extratos das micocinas WA40M1, WA45M2 e WA92M3 produzidas pelas cepas WA40, WA45 e WA92 de *W. anomalus* apresentaram atividade inibitória em cepas de *C. albicans*, apresentaram também, nenhuma atividade citotóxica. Estas propriedades demonstram que as micocinas de *W. anomalus* são candidatos em potencial no desenvolvimento de uma nova droga antifúngica, podendo também ser utilizadas no sinergismo com outros antifúngicos.

Referências

1. McManus BA, Coleman DC. Molecular Epidemiology, Phylogeny and Evolution of *Candida Albicans*, Infection, Genetics and Evolution. 2014, 21: 166–178.
2. Wang YC, Tsai IC, Lin C, Hsieh WP, Lan CY, Chuang YJ, *et al.* Essential functional modules for pathogenic and defensive mechanisms in *Candida albicans* infections. Biomed Res Int. 2014, 1-15.
3. Lehnert T, Timme S, Pollmächer J, Hünninger K, Kurzai O, Figge MT. Bottom-up modeling approach for the quantitative estimation of parameters in pathogen-host interactions. Front Microbiol. 2015, 6: 1–15.
4. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis. 2008; 46: 120–128.
5. Tan HW, Tay ST. Anti-Candida activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts. Trop Biomed. 2011; 28: 175–180.

6. Buzdar MA, Chi Z, Wang Q, Hua MX, Chi ZM. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91: 1571–1579.
7. Bevan M, Makower E. The physiological basis of the killer character in yeast. In: ed.J. Genetics today XilCG, editor. 1963.
8. Robledo-Leal E, Villarreal-Treviño L, González GM. Occurrence of killer yeasts in isolates of clinical origin. *Trop Biomed*. 2012; 29: 297–300.
9. Buzzini P, Turchetti B, Vaughan-Martini AE. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: The state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res*. 2007; 7: 749–760.
10. Comitini F, Di Pietro N, Zacchi L, Mannazzu I, Ciani M. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: Purification and characterization. *Microbiology*. 2004; 150: 2535–2541.
11. Chen WB, Han YF, Jong SC, Chang SC. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66: 5348–5352.
12. Hodgson VJ, Button D, Walker GM. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*. 1995; 141: 2003–2012.
13. Kandel JS, Stern TA. Killer phenomenon in pathogenic yeast. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979; 15: 568–571.
14. Cappelli A, Ulissi U, Valzano M, Damiani C, Epis S, Gabrielli MG, *et al.* A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*. 2014; 9.
15. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5^a ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2011.
16. Walker GM, McLeod AH, Hodgson VJ. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 127: 213–222.
17. Izgü F, Altınbay D, Sertkaya A. Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005; 69: 2200–2206.
18. Séguy N, Polonelli L, Dei-Cas E, Cailliez JC. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998; 22: 145–149.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
20. Scott TA, Melvin EH. Determination of Dextran with Anthrone. *Anal Chem*. American Chemical Society; 1953; 25: 1656–1661.

21. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
22. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*. 1979; 66: 175–177.
23. Latoud C, Peypoux F, Michel G, Genet R, Morgat JL. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 856: 526–535.
24. Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 78: 17–28.
25. Loguercio-Leite C, Groposo C, Dreschler-Santos ER, Figueiredo N de F, Godinho P da S, Abrão RL. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. *Biotemas*. 2006. 17–27.
26. Mendes E. *Alergia no Brasil Alérgenos Regionais e Imunoterapia*. São Paulo: Manole; 1989.
27. Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54: 1099–1103.
28. Tay S, Lim S, Tan H. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 1–11.
29. Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011; 99: 121–125.
30. Bilinski CA, Innamorato G, Stewart GG. Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 50: 1330–1332.
31. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*. 1979; 66: 175–177.
32. Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*. 1965; 13: 269–282.
33. Gandra RF, Melo TA, Matsumoto FE, Pires MFC, Croce J, Gambale W, *et al.* Allergenic evaluation of *Malassezia furfur* crude extracts. *Mycopathologia*. 2002; 155: 183–189.
34. Bhattacharyya S. In-vitro Inhibition of Biofilm Formation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Heat Stable Compounds in Culture Filtrate of *Aspergillus flavus*. *J Clin Diagnostic Res*. 2013; 2167–2169.

35. Sorensen KN, Kim KH, Takemoto JY. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*? *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2710–2713.
36. Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 1073–1080.
37. Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol.* 2005; 242: 215–248.

Fig 1

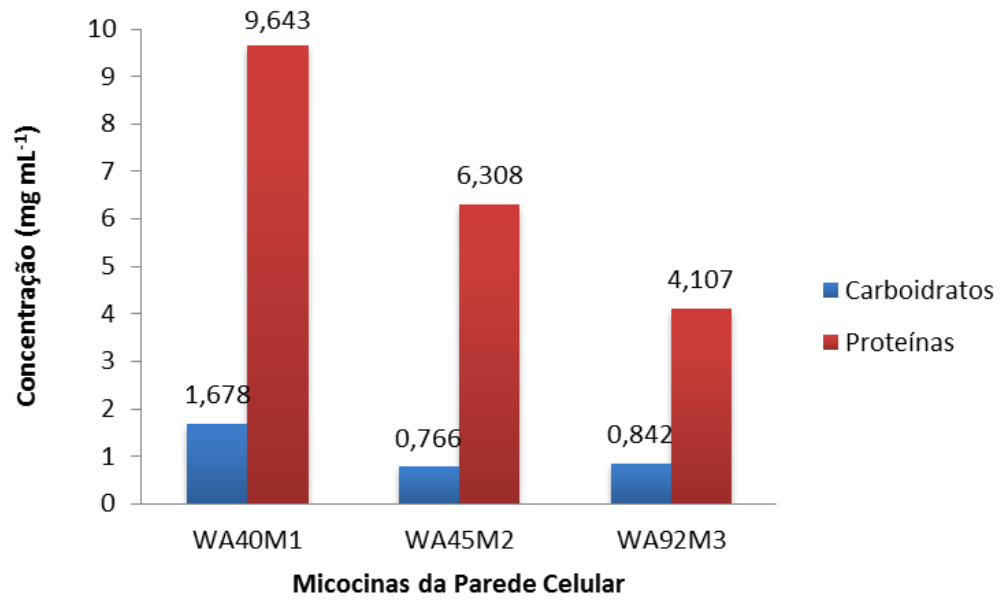


Fig 2

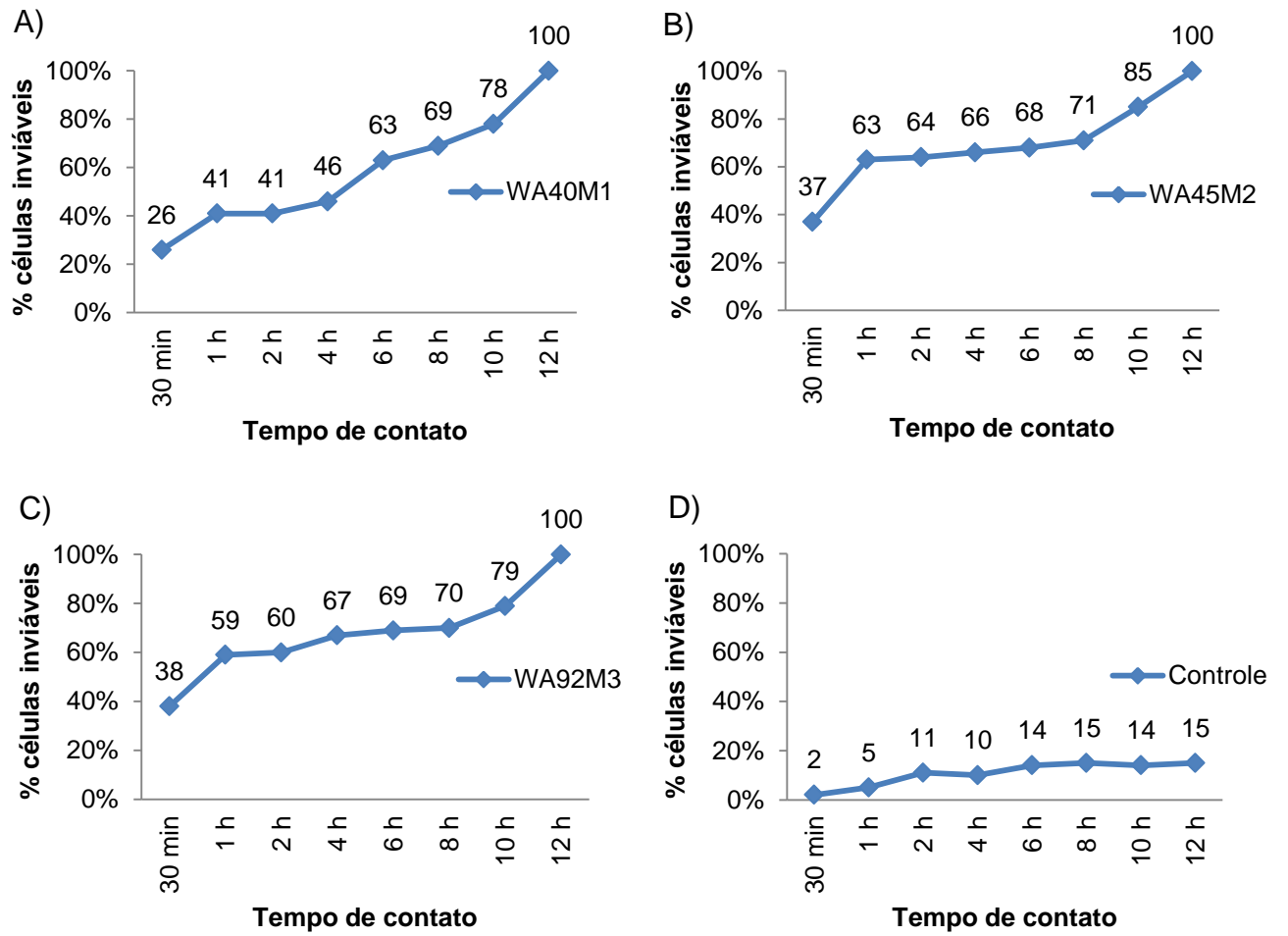
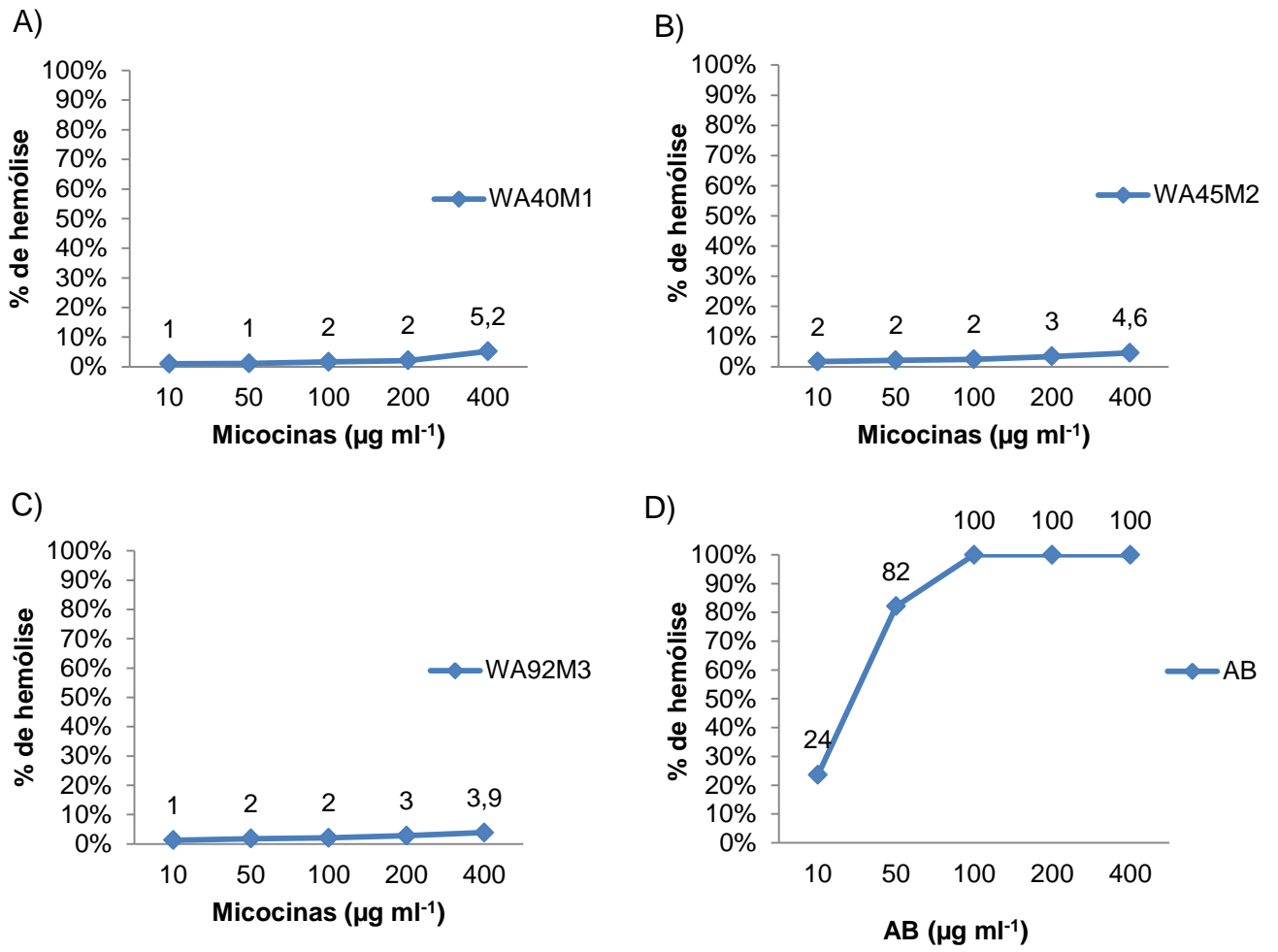


Fig 3



6 CONCLUSÕES GERAIS

- Cepas isoladas do solo de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 produziram micocinas que foram capazes de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos.
- As micocinas presentes no sobrenadante da cultura das cepas de *W. anomalus* WA40, WA45 e WA92 foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos clínicos *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*.
- As micocinas da parede celular das cepas de *W. anomalus* extraídas pelo líquido de Coca demonstraram atividade de inibição frente a 30 cepas de *C. albicans* isoladas de sangue.
- Tanto as micocinas do sobrenadante da cultura como as micocinas da parede celular não apresentaram toxicidade em eritrócitos humanos, tendo uma percentagem de hemólise muito inferior quando comparadas com a causada pela anfotericina B.
- Nos testes de viabilidade foi possível observar que todas as células de *C. albicans* ficaram inviáveis a partir de 12 horas de contato com os extratos de micocinas da parede celular das cepas de *W. anomalus*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se considerar que o trabalho apresenta algumas perspectivas:

- Purificar as micocinas secretadas pelas cepas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40, WA45 e WA92.
- Caracterizar as micocinas purificadas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40, WA45 e WA92.
- Comparação do espectro de ação das micocinas purificadas com antibacterianos de referência para o tratamento de infecções causadas por *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*.
- Comparação do espectro de ação das micocinas purificadas com antifúngicos de referência para o tratamento de candidíase e de criptococose.
- Realizar testes *in vivo*, em cobaias, para verificar a atividade antimicrobiana e a toxicidade das micocinas.
- A partir da caracterização molecular das glicoproteínas propor um análogo sintético para uso comercial em grande escala.

ANEXO 1

Normas da Revista Yeast

Manuscript Submission *Yeast* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click to navigate to the *Yeast* online submission site. **IMPORTANT:** Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are DOC (.doc) or RTF (.rtf). Figures should be provided in TIFF (.tiff) or EPS (.eps) format.

LATEX USERS: For reviewing purposes you should upload PDF file of the manuscript that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISION SUBMISSION

The files uploaded at this stage should be of sufficient quality for publication. Therefore the authors should provide:

- The manuscript text in Word format. Tables must be on separate pages after the reference list and must be provided in editable format, ie not embedded.
- Figures should be uploaded as separate figure files in high-resolution TIFF or EPS format.

LATEX USERS: When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your now revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded documents

must be deleted. If your manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [and](#) visit.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: .

Manuscript style. The language of the journal is English. 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)** .
- Enter an **abstract** of up to 250 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.

The text should generally be divided into: Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion; References; Tables, Figure Legends. Please avoid section numbering.

Major reviews will be commissioned, but minor reviews and original research papers are solicited, together with any other reports, letters or announcements of potential

interest to the readers of the journal. There is no restriction on length, although manuscripts may be returned for shortening at the discretion of the editor.

Commercial literature should be sent to Editorial Office. Book Reviews should be submitted via the online system.

Data. Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission

Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

Nomenclature. When using genetic nomenclature authors should follow the guidelines laid down in Cherry, JM. 1998. Genetic Nomenclature Guide *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics*: S.10-S.11 (available for download at [http://www.yeastgenome.org/](#)). Authors naming a new gene or renaming an old gene are asked to use the Gene Registry at the Saccharomyces Genome Database:

Authors should use yeast names consistent with Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, Third Edition, Cambridge University Press.

Nucleic Acid Sequences. Any sequence information included in a manuscript **MUST** be submitted to either the EMBL data library or GenBank, and the Accession Number included at the end of the Abstract section, before the paper will be published. Sequence data **MUST** be submitted at the first point of submission .

Protein Sequences. Sequences which have been determined by direct sequencing of the protein **MUST** be submitted to Swiss-Prot. Please note that Swiss-Prot do not

provide accession numbers **IN ADVANCE** for protein sequences that are the result of translation of nucleic acid sequences. These translations will automatically be forwarded from the EMBL nucleotide database and are assigned UniProtKB/Swiss-Prot accession numbers on incorporation into UniProtKB/TrEMBL. Results from characterization experiments should also be submitted to Swiss-Prot. This can include such information as function, subcellular location, subunit etc.

SWISS-PROT submissions; email:

Microarray data. For all papers containing microarray data, compliance with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) standards is mandatory, except in cases where a microarray is used to identify one, or a few, genes, and these individual genes are then the subject of much deeper analysis that validates their selection. In this latter case, the microarray is merely a 'primary screen' and, just as for a genetic screen, one wouldn't necessarily publish all the data at once. Submission of microarray data to a central repository (GEO or ArrayExpress) is mandatory and must be completed before submission of a manuscript. Accession number/s for the data must be included in the manuscript. MIAME guidelines for authors, editors and reviewers of microarray gene expression papers:

GEO (Gene Expression Omnibus):

ArrayExpress online submission tool (MIAMExpress):

Abbreviations. All abbreviations must be defined in full in the first instance.

Reference style . References should be quoted in the text as name and year within square brackets and listed at the end of the paper alphabetically. **For reviews only**, references should be cited by number in the text. The reference list should be ordered alphabetically and numbered in sequence. Hence references in the text will not be in numerical sequence. All references must be complete and accurate. Online citations should include date of access. Use Medline abbreviations for journal names. They can be found at: email: . If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style:

Cooper TG, Sumrada R. 1975. Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **121**:571-576.

Spencer JFT, Spencer DM, Smith ARW. (eds). 1984. *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*. Springer-Verlag: Godalming; 121-124.

Dart EC, Pioli D, Atherton KT. 1981. Genetic engineering. In *Essays in Microbiology*, Norris JR, Richmond MH. (eds). John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester; 311-332.

Illustrations. Supply each illustration on a separate page, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Tints are not acceptable; lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. Supply artwork at the intended size for printing. The artwork must be sized to the text width of 76 mm (1 column) and 156 mm (2 column).

Colour Policy. Illustrations where **colour** is essential to the biological meaning (e.g. pigmented colonies, FISH, or microarray datasets) will be published at no cost to the author. Non-essential **colour** will be printed in black and white, but may be published in colour if part of the cost (£300 for each page containing a colour illustration) is borne by the authors. If colour illustrations are supplied as files in either TIFF or EPS format, they will be used in the online PDF of the article at no cost to the authors, even if the illustration is printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley Online Library* site.

SPECIAL SECTIONS

Yeast contains two special sections in which short communications in the designated areas may be published. Such communications will undergo a rapid review process.

1. Sequencing Reports

Sequence data may be published rapidly with little accompanying commentary beyond the precise location of the sequenced region within its chromosome. Sequence submissions must comply with the rules laid down in the section on

Nucleic Acid Sequences above. The publication of single gene sequences is not encouraged unless accompanied by extensive experimental data on function.

Apart from the sequence of an individual gene, the nucleotide sequence will only be published as supplementary information. Rather, authors should provide a detailed 'features table' with co-ordinates.

The format of sequences should be kept simple, being confined to nucleotides and amino acids. Important regions should be highlighted by nucleotide sequence number in an accompanying legend

2. **Genome Screen Reports**

These reports may include descriptions of new reagents (plasmids, strains etc) or techniques which facilitate the systematic analysis of gene function, as well as accounts of the results of such systematic studies. The journal will also accept papers which contribute to the systematic analysis of the function of novel genes discovered as a result of genome sequencing.

Accepted Articles. Accepted Articles is a Wiley Blackwell service whereby peer reviewed, accepted articles or abstracts are published online as and when they are ready, prior to their ultimate inclusion in a print or online issue and without having been copy-edited or typeset. This service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers immediately after acceptance. Readers should note that articles published within Accepted Articles have been fully refereed, but should not be considered the version of record. Wiley Blackwell cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of Wiley Blackwell.

EarlyView. EarlyView is Wiley's exclusive service presenting individual, complete, peer-reviewed articles as soon as they are ready before the release of the compiled print issue.

Dual Use. Yeast expects that all authors will conform to the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines for Dual Use Life Sciences Research..

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see.

Electronic Enhancement/Supporting Information. Data that are (i) not amenable to presentation in a traditional print format, (ii) of interest primarily to specialists and do not require Journal page space, or (iii) particularly useful to the community in electronic (downloadable) form can be published online as supporting information hosted within *Wiley Online Library*.

Further Information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the main author prior to publication for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Further offprints and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Editorial Office

The *Yeast* Editorial Office may be contacted at Wiley Blackwell, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK

Fax: 44 (0)1865 714591

ANEXO 2

Normas da Revista PLOS ONE

Parts of a Submission**Title**

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, concise, comprehensible to readers outside the field	descriptive, Impact of Cigarette Smoke Exposure and on Innate Immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> Model Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial
Short title	50 characters	State the topic of the study	Cigarette Smoke Exposure and Innate Immunity SODIS and Childhood Diarrhoea

Titles should be written in title case (all words capitalized except articles, prepositions, and conjunctions). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list**Who belongs on the author list**

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy. Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. Read more about Acknowledgments. Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

One corresponding author should be designated in the submission system as well as on the title page.

One corresponding author should be designated in the submission system. However, this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication.

Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list, and include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

The corresponding author is responsible for making sure all authors approve the final manuscript before submission. *PLOS ONE* will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system. The length limit is 1 page.

The cover letter should include the following information:

- Summarize the study's contribution to the scientific literature
- Relate the study to previously published work
- Specify the type of article (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describe any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggest appropriate Academic Editors to handle your manuscript (see the full list of Academic Editors)
- List any opposed reviewers

IMPORTANT: Do not include requests to reduce or waive publication fees in the cover letter. This information will be entered separately in the online submission system.

Read about publication fee assistance.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Download sample title, author list, and affiliations page (PDF)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Human or animal subjects and/or tissue or field sampling

Methods sections describing research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the reporting guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Data

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data). For more information on how best to provide data, read our policy on data availability. PLOS does not accept references to “data not shown.”

Cell lines

Methods sections describing research using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the reporting guidelines for cell line research for more information.

New taxon names

Methods sections of manuscripts adding new taxon names to the literature must follow the reporting guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled “Results and Discussion”) or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled “Discussion”). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn.

Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* Criteria for Publication for more information.

Copyediting

manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service.”

Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the *PLOS ONE* publication criterion for language standards may be rejected.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the online submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on pre-print servers, if the manuscript is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). *PLOS* uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the ICMJE sample references.

A reference management tool, EndNote, offers a current style file that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Read the supporting information guidelines for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Read the guidelines for figures.

Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Read more about figure captions.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

Read the guidelines for tables.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

Read our policy on data availability.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

See our list of recommended repositories.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include Dryad and FlowRepository. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please email us.

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers or DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- PubChem

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places like the journal homepage or in search results.

The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the submission, i.e., a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows.

If no striking image is uploaded, we will designate a figure from the submission as the striking image.

Striking images should not contain potentially identifying images of people. Read our policy on identifying information.

The PLOS content license also applies to striking images. Read more about the content license.

Additional Information Requested at Submission

Funding statement

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

This information will be published with the final manuscript, if accepted, so please make sure that this is accurate and as detailed as possible. You should not include this information in your manuscript file, but it is important to gather it prior to submission, because your financial disclosure statement cannot be changed after initial submission.

Your statement should include relevant grant numbers and the URL of any funder's web site. Please also state whether any individuals employed or contracted by the funders (other than the named authors) played any role in: study design, data

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If so, please name the individual and describe their role.

Read our policy on disclosure of funding sources.

Competing interests

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

All potential competing interests must be declared in full. If the submission is related to any patents, patent applications, or products in development or for market, these details, including patent numbers and titles, must be disclosed in full.

Read our policy on competing interests.

Manuscripts disputing published work

For manuscripts disputing previously published work, it is *PLOS ONE* policy to invite input from the disputed author during the peer review process. This procedure is aimed at ensuring a thorough, transparent, and productive review process.

If the disputed author chooses to submit a review, it must be returned in a timely fashion and contain a full declaration of all competing interests. The Academic Editor will consider any such reviews in light of the competing interest.

Authors submitting manuscripts disputing previous work should explain the relationship between the manuscripts in their cover letter, and will be required to confirm that they accept the conditions of this review policy before the manuscript is considered further.

Related manuscripts

Upon submission, authors must confirm that the manuscript, or any related manuscript, is not currently under consideration or accepted elsewhere. If related work has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors must include a copy with the submitted article. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

We strongly discourage the unnecessary division of related work into separate manuscripts, and we will not consider manuscripts that are divided into “parts.” Each submission to *PLOS ONE* must be written as an independent unit and should not rely on any work that has not already been accepted for publication. If related manuscripts are submitted to *PLOS ONE*, the authors may be advised to combine them into a single manuscript at the editor's discretion.

Guidelines for Specific Study Types

Human subjects research

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or by equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Authors should be able to submit, upon request, a statement from the IRB or ethics committee indicating approval of the research. We reserve the right to reject work that we believe has not been conducted to a high ethical standard, even when formal approval has been obtained.

Subjects must have been properly instructed and have indicated that they consent to participate by signing the appropriate informed consent paperwork. Authors may be asked to submit a blank, sample copy of a subject consent form. If consent was verbal instead of written, or if consent could not be obtained, the authors must explain the reason in the manuscript, and the use of verbal consent or the lack of consent must have been approved by the IRB or ethics committee.

All efforts should be made to protect patient privacy and anonymity. Identifying information, including photos, should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF). More information about patient privacy, anonymity, and informed consent can be found in the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Privacy and Confidentiality guidelines.

Manuscripts should conform to the following reporting guidelines:

- Studies of diagnostic accuracy: STARD
- Observational studies: STROBE
- Microarray experiments: MIAME
- Other types of health-related research: Consult the EQUATOR web site for appropriate reporting guidelines

Methods sections of papers on research using human subjects or samples must include ethics statements that specify:

- **The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s).** If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed
- **Whether informed consent was written or oral.** If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:
 - Why written consent could not be obtained
 - That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent
 - How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

- Explicitly describe their methods of categorizing human populations
- Define categories in as much detail as the study protocol allows

- Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency
- Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis

In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: “Caucasian” should be changed to “white” or “of [Western] European descent” (as appropriate); “cancer victims” should be changed to “patients with cancer.”

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding human subjects research, see the Publication Criteria and Editorial Policies.

Clinical trials

Clinical trials are subject to all policies regarding human research. *PLOS ONE* follows the World Health Organization's (WHO) definition of a clinical trial:

A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes [...] Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc.

All clinical trials must be registered in one of the publicly-accessible registries approved by the WHO or ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors). Authors must provide the trial registration number. Prior disclosure of results on a clinical trial registry site will not affect consideration for publication. We reserve the right to inform authors' institutions or ethics committees, and to reject the manuscript, if we become aware of unregistered trials.

PLOS ONE supports prospective trial registration (i.e. before participant recruitment has begun) as recommended by the ICMJE's clinical trial registration policy. **Where trials were not publicly registered before participant recruitment began**, authors must:

- Register all related clinical trials and confirm they have done so in the Methods section

- Explain in the Methods the reason for failing to register before participant recruitment

Clinical trials must be reported according to the relevant reporting guidelines, i.e. CONSORT for randomized controlled trials, TREND for non-randomized trials, and other specialized guidelines as appropriate. The intervention should be described according to the requirements of the TIDieR checklist and guide. Submissions must also include the study protocol as supporting information, which will be published with the manuscript if accepted.

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the CONSORT reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the CONSORT Statement web site. Before the paper can enter peer review, authors must:

- Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript
- Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed CONSORT checklist as supporting information (which will be published alongside the paper, if accepted). This should be named S1 CONSORT Checklist.
- Include the CONSORT flow diagram as the manuscript's "Fig 1"

Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

Fungal names

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature.

Effective January 2012, the description or diagnosis of a new taxon can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).