



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto



**Produção, Purificação e Ação Antimicrobiana do Extrato Fúngico do
Trichosporon asahii.**

THAÍS YUMI SHINYA

São José do Rio Preto

2012

Thaís Yumi Shinya

Produção, Purificação e Ação Antimicrobiana do Extrato Fúngico do
Trichosporon asahii.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Médica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

São José do Rio Preto
2012

Shinya, Thaís Yumi.

Produção, purificação e ação antimicrobiana do extrato fúngico do *Trichosporon asahii* / Thaís Yumi Shinya. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Pedro de Oliva Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. *Trichosporon asahii*. 2. Extratos antimicrobianos. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Microbiologia médica. I. Oliva Neto, Pedro de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.61

Thaís Yumi Shinya

Produção, Purificação e Ação Antimicrobiana do Extrato Fúngico do
Trichosporon asahii.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Médica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Professor Assistente Doutor
UNESP – Assis
Orientador

Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior
Professor Assistente Doutor
UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Valéria Marta Gomes Lima
Professora Assistente Doutora
UNESP – Assis

São José do Rio Preto
05 de Novembro de 2012

Dedico aos meus pais, Paulo e Meiry, que sempre me encorajaram a dar o melhor de mim, e apoiaram todas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao amigo e professor Pedro de Oliva Neto, meu orientador há cinco anos, que me acolheu em seu laboratório de braços abertos, sempre com muita paciência para ensinar e corrigir;

Agradeço aos meus pais, Meiry e Paulo Shinya, pelo amor incondicional prestado, paciência pelos meses que fiquei sem voltar para casa e por nunca hesitarem em oferecer o melhor para mim. Devo todas minhas conquistas a vocês;

Ao meu namorado Leonardo Dallacqua, que me aguentou, aconselhou e apoiou, me levava e buscava para onde fosse preciso, me fez companhia e junto ao Bomber me proporcionou conforto e muitas risadas. Admiro e amo muito;

À professora Valéria Lima, que tirou inúmeras dúvidas e deu dicas de como aprimorar o trabalho;

Ao pessoal do LABI (I e II), pelo companheirismo e por me proporcionar bons momentos tanto no lab quanto fora dele. Não poderia ter encontrado um grupo tão único e especial como esse;

Agradeço em especial: à Ana Flávia Carvalho, sempre disposta a me ajudar, ensinar e orientar no laboratório; ao Bruno Oliveira, por me ajudar a dominar o monstro fermentador, e tantos outros aparelhos e técnicas que perdi a conta; à Kassandra Sussi (Kass), que também me salvou diversas vezes, além de ter se tornado uma amiga indispensável e me proporcionar muitas risadas toda hora; à Mari Albano, que me ajudou muito no lab, ouviu meus desabafos não só durante o mestrado, mas toda graduação, me acolheu e acompanhou na disciplina em Botucatu, enfim, mais uma irmã que ganhei em Assis; ao Eric Lima, por trabalharmos muitas vezes juntos, rindo sempre e conspirando às vezes; à Andressa Mizobuchi e Érika Matsuda, que me acompanharam e, literalmente, suaram a camisa para me ajudar; à Mari Azevedo, que me ensinou quase todas técnicas desse experimento; à Bruna Escaramboni, Douglas Fernandes, Gilberto Coradi (Hawls), Ivan Nascimento e Aline Freitas que também contribuíram indispensavelmente para realização dos experimentos.

À irmã Thaís Riolfi (Gon), e o irmão Bruno Crulhas (Johnson), pela amizade prestada, companheirismo, sempre ouvir meus desabafos, e por tantas experiências vivenciadas juntos durante toda nossa estadia em Assis;

Muito obrigada ao Sérgio Moraes, nosso técnico de laboratório e amigo, ao Gilberto Millani e ao Allan, que prestaram socorro diversas vezes;

Agradeço à Suzel e ao Rogério Dallacqua, por me acolherem em Rio Preto, à família da Mari Albano pela estadia em São Manuel, e à Camila Daronco (Pampers), que me ofereceu moradia em Botucatu;

Agradeço à Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” – Campinas - pela doação das cepas utilizadas nos experimentos deste trabalho;

À CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

“As dificuldades crescem à medida que nos aproximamos de nosso objetivo” (Johann Goethe).

RESUMO

Devido à necessidade de obtenção de novas moléculas com ação antimicrobiana, o presente trabalho visou investigar a capacidade antagônica do extrato produzido pelo fungo *Trichosporon asahii*. O extrato foi obtido pela fermentação do fungo em fermentador de bancada 7L, a 28°C por 72 horas. O caldo fermentado foi centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante a fração denominada extrato bruto, que foi seco em estufa (37°C) e ressuscitado em água destilada, para testes de ação antimicrobiana contra os microorganismos *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 27853, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. O teste de sensibilidade foi o de Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM e CFM), através da macrodiluição em tubos e plaqueamento. Numa segunda etapa, o extrato bruto foi submetido a uma separação líquido-líquido utilizando os solventes hexano e diclorometano, obtendo-se frações aquosa e orgânica. Numa última etapa de purificação, o extrato diclorometânico passou por uma cromatografia de troca-iônica, cromatografia em sílica gel e precipitação com sulfato de amônio. Foram calculados alguns parâmetros de fermentação do *T. asahii*, através dos métodos de quantificação de açúcares redutores, pH, viabilidade e brotamento das leveduras e quantidade total de células. O teste de sensibilidade do extrato bruto demonstrou apenas atividade antibacteriana (30000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, 33000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 75000 µg/mL sobre *X. campestris*). Observou-se uma diminuição da CBM para a fração diclorometânica (17500 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, 20000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 60000 µg/mL sobre *X. campestris*). Na pré-purificação, o método que demonstrou maior eficácia para o propósito foi o de cromatografia de troca-iônica (12000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, 15000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 55000 µg/mL sobre *X. campestris*), sendo esses valores referentes à primeira fração recolhida da passagem do extrato diclorometânico pela resina catiônica Sepharose. Quanto aos parâmetros de fermentação, a quantidade de açúcares redutores diminuiu drasticamente até as 24 primeiras horas de fermentação, em contraste ao aumento da densidade celular. O pH variou de 5,5 a 6,8 ao longo da fermentação. O nível de viabilidade celular e brotos vivos se mantiveram altos ao longo do cultivo, respectivamente 72-98% e 64-95% e quantidade de células aumentou ao longo da fermentação, apresentando uma fase log com 24 h de fermentação, com uma velocidade específica de crescimento (μ) que variou de 0,05-0,08 h⁻¹. O rendimento celular

($Y_{x/s}$) foi de 0,29 g de biomassa/g de AR consumido. Apesar de alta, as CBMs indicam a presença de um composto com ação antimicrobiana produzida pelo fungo *T. asahii*.

Palavras-chave: *Trichosporon asahii*, extratos antimicrobianos, Concentração Bactericida Mínima, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Nowadays there is a demand for new natural molecules that may contribute to the control of pathogenic microorganisms. In this study it was aimed to investigate the antimicrobial ability of the broth produced by the culture of the fungus *Trichosporon asahii*. The extract was obtained by fermentation of *T. asahii* bench 7 L fermenter at 28° C for 72 hours. The fermented broth was centrifuged at 2500 rpm for 20 minutes, and the supernatant fraction termed crude extract, which was dried in oven (37° C) and resuspended in distilled water for testing antimicrobial activity against the microorganisms *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and ATCC 27853 and *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. The method used for quantification of antibiotic was the Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentration (MBC and MFC) by macrodilution tubes and plating. In a second stage, the crude extract was subjected to liquid-liquid separation using dichloromethane and hexane solvents to yield aqueous and organic fractions. A new purification step from the dichloromethanic fraction passed through an ion exchange chromatography, silica gel chromatography and by precipitation with ammonium sulfate. It was also calculated some fermentation parameters of *T. asahii* by analytical methods for quantifying reducing sugars, pH, cell viability, budding yeasts and total cells. The MBC test showed only antibacterial activity (33,000 µg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 27853, 30,000 µg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 9027 and 75,000 µg/mL for *X. campestris*). There was a decrease in the MBC for the dichloromethanic fraction (20,000 µg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 27853, 17,500 µg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 9027 and 60,000 µg/mL for *X. campestris*). In the pre-purification step, the ion exchange chromatography was the more effective method. The lowest MBC was found for the first fraction collected from the dichloromethane extract by passing in the Sepharose cation exchange resin. The MBC for *P. aeruginosa* ATCC 9027 and ATCC 27853 were respectively 12,000 µg/mL and 15,000 µg/mL L, and 55,000 µg/mL for *X. campestris*). Regarding the parameters of fermentation, the amount of reducing sugars decreases sharply until the first 24 hours of fermentation, in contrast to the increase in cell density. The pH ranged from 5.5 to 6.8 throughout the fermentation. The level of cell viability remained alive and shoots high throughout the culture, respectively 72-98% and 64-95%, and cell number increased throughout the fermentation, showing a log phase at 24 hours fermentation with a specific speed growth (μ) ranging from 0.05 to 0.08 h⁻¹. The cell yield (Y_x/s) was 0.29 g biomass / g of

reducing sugars consumed. CBMs indicate the presence of a compound with antimicrobial activity produced by the fungus T. asahii.

Keywords: *Trichosporon asahii, antimicrobial extract, Minimum Bactericidal Concentration, Pseudomonas aeruginosa.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Antimicrobianos produzidos por fungos	7
2.2. Toxinas <i>killer</i>	7
2.3. O gênero <i>Trichosporon</i>	10
2.4. O gênero <i>Candida</i>	14
2.5. O gênero <i>Malassezia</i>	17
2.6. O gênero <i>Trichophyton</i>	21
2.7. O gênero <i>Xanthomonas</i>	24
2.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.8.1. Infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	30
2.8.2. Fatores de virulência	31
2.8.3. Fatores de resistência de <i>P. aeruginosa</i>	32
2.8.3.1. Mecanismos de resistência adquirida.....	33
2.8.3.2. Permeabilidade da membrana externa.....	33
2.8.3.3. Enzimas inativadoras de aminoglicosídeos.....	35
2.8.3.4. Alteração alvo de fluoroquinolonas	35
2.8.3.5. Produção de β -lactamases por <i>P. aeruginosa</i>	35
2.8.3.6. Resistência de <i>P. aeruginosa</i> à polimixina	36
2.8.4. <i>P. aeruginosa</i> e os antibióticos	37
2.9. Terapias antifúngicas.....	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Micro-organismos e cultivo	40
4.2. Ativação e preservação dos micro-organismos utilizados	41
4.3. Produção do extrato fúngico de <i>T. asahii</i> em biorreator	42
4.4. Métodos de pré-purificação do extrato líquido bruto	43
4.4.1. Através de solventes orgânicos	43
4.4.2. Cromatografias de troca iônica e de coluna de sílica em gel	45

4.4.3. Precipitação com sulfato de amônio.....	46
4.5. Teste de Concentração Fungicida e Bactericida Mínima.....	46
4.5.1. Padronização dos inóculos dos micro-organismos.....	46
4.5.2. Determinação das Concentrações Fungicidas e Bactericidas Mínimas	47
4.6. Procedimentos analíticos da fermentação	48
4.6.1. Testes de quantificação da biomassa celular	48
4.6.2. Viabilidade celular e brotamento	49
4.6.3. Quantificação de açúcares redutores	50
4.6.4. Medição do pH.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Rendimento do extrato bruto.....	51
5.2. Avaliação antimicrobiana do extrato bruto	51
5.3. Determinação da CBM dos extratos pré-purificados	54
5.4. Parâmetros de fermentação do <i>T. asahii</i>	59
5.4.1. Quantificação do número de células ao longo da fermentação	59
5.4.2. Determinação da viabilidade celular e taxa de brotamento.....	61
5.4.3. Quantificação dos açúcares redutores (AR) ao longo da fermentação	63
5.4.4. Variação do pH	64
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	93
ANEXO A.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colônia de <i>Trichosporon asahii</i> em meio para fungos CTT 2768	11
Figura 2 - Leveduras (à esquerda), pseudo-hifas (centro) e hifas (à direita) de <i>Candida</i> spp.	16
Figura 3 - Colônia de <i>M. pachydermatis</i>	19
Figura 4 - Colônia de <i>T. mentagrophytes</i> (à esquerda) e macroconídeos e microconídeos típicos de <i>T. mentagrophytes</i> var <i>mentagrophytes</i>	24
Figura 5 - Colônia de <i>Xanthomonas</i> spp	26
Figura 6 - Podridão-negra em folha de couve, com lesão em forma de “v”, com amarelecimento do tecido	27
Figura 7 - Colônia de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 8 - Parede celular de bactérias Gram-negativas	32
Figura 9 - Fermentador 7L TECBIO - TECNAL, Piracicaba, SP	43
Figura 10 - Fluxograma da metodologia de pré purificação do extrato líquido bruto através de solventes orgânicos.....	44
Figura 11 - Curva de crescimento do <i>T. asahii</i> ao longo do cultivo em fermentador de bancada 7L a 28°C através de três testes de quantificação celular.....	60
Figura 12 - Viabilidade celular do <i>T. asahii</i> ao longo da fermentação em fermentador de bancada 7L durante 72 h a 28°C.....	62
Figura 13 - Quantificação de Açúcares Redutores e Biomassa produzida ao longo da fermentação do <i>T. asahii</i> em fermentador de bancada 7L.....	64
Figura 14 - Variação do pH ao longo da fermentação do <i>T. asahii</i> em fermentador de bancada 7L.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva de calibração para realização do Método DNS.....	50
Tabela 2 - Tabela de concentração de massa seca obtida a partir do extrato bruto de <i>T. asahii</i> incubado a 28°C em fermentador de 7L após 72 horas.....	51
Tabela 3 - Teste de macrodiluição em tubos a partir do extrato bruto seco obtido do cultivo de <i>T. asahii</i> frente aos micro-organismos teste, incubados a 28°C por 24 h	52
Tabela 4 - Teste de CBM a partir do extrato bruto de <i>T. asahii</i> fracionado com os solventes hexano e diclorometano, após secagem.....	55
Tabela 5 - Teste de macrodiluição em tubos a partir do extrato diclorometânico obtido do extrato bruto de <i>T. asahii</i> , pré-purificado através de cromatografia de troca-iônica, sílica gel e precipitação com sulfato e amônio	56
Tabela 6 - Cálculo de rendimento de sólidos presentes nos extratos após separação líquido-líquido e cromatografia de troca-iônica, em relação ao extrato bruto	59
Tabela 7 - Quantificação de células de <i>T. asahii</i> ao longo do cultivo de 72 h em fermentador de bancada 7L, utilizando três métodos de quantificação	60
Tabela 8 - Taxa de brotamento do <i>T. asahii</i> em cultivo em fermentador de bancada 7L a 28°C por 72 h.....	62
Tabela 9 - Concentração de Açúcares Redutores ao longo da fermentação do <i>T. asahii</i> em fermentador de bancada 7L	63

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos são seres vivos que incluem bactérias, fungos, protozoários, algas e vírus. Apesar de muitos serem responsáveis pelo apodrecimento dos alimentos e por causar doenças e infecções em animais e plantas, a maioria fornece contribuições cruciais para manutenção no nosso ambiente e bem-estar dos seres vivos (TORTORA et al., 2005). Os fungos são responsáveis pela decomposição de grande parte da matéria orgânica no planeta e por contribuírem nos ciclos biogeoquímicos (FLORENT, 2000). O primeiro metabólito fúngico descoberto que atua inibindo o crescimento de outros micro-organismos foi a Penicilina, sendo sua descoberta responsável pela motivação da produção industrial desse antibiótico (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 1988).

Algumas leveduras produzem compostos que inibem o crescimento de outras leveduras, micro-organismos procariotos e eucariotos, sem afetar seu crescimento (FUENTEFRIA, 2004; SENTER, 2010). O fenômeno é conhecido como *killer*, e é uma forma de competição que se assemelha à produção de bacteriocinas de bactérias (SENER, 2010).

Toxinas *killer*, ou micocinas, são proteínas ou glicoproteínas que possuem baixa massa molecular, produzidos por leveduras (GOLUBEV, 2006). O fenótipo micocinogênico tem sido observado em diversos gêneros de fungos dos filos *Basidiomycota* e *Ascomycota*, dentre eles *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Aureobasidium*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Trichosporon* (WALKER et al., 1995; GOLUBEV et al., 2002; FUENTEFRIA, 2007; SENTER et al., 2011).

O micro-organismo *Trichosporon asahii* causa uma infecção em seres humanos que pode ir desde o acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos graves em indivíduos com imunodepressão (WALLING et al., 1987). O fungo demonstrou produzir compostos com ação antimicrobiana contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (DUTRA, 2009; GARGEL et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011).

O gênero *Candida* é de fungos que pertencem taxonomicamente ao grupo dos *Ascomycetos* (SIDRIM; ROCHA, 2004). Fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, podendo eventualmente se tornar um patógeno oportunista, envolvendo unhas, trato respiratório e pele, do trato digestivo e genital e de regiões mucocutâneas (RIPPON, 1988).

As leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota normal de mamíferos (FRASER, 1961). Apresentada como colonizadora comum da orelha externa, pele, lábios e orifício anal de cães saudáveis, *Malassezia pachydermatis* tem sido isolada tanto de cães saudáveis,

quanto com dermatite pruriginosa ou otite externa (FRASER, 1965). Devido a esta alta frequência de isolamento dessa espécie em cães não-sadios, a espécie torna-se um invasor patogênico secundário (BOND et al., 1995).

Os fungos do gênero *Trichophyton* são responsáveis pela dermatofitose em animais domésticos (CABAÑES, 2000). Essa doença cutânea é contagiosa, apresentam capacidade de invasão de tecidos queratinizados de animais e humanos, podendo afetar pelos, unhas, penas, cascos e células queratinizadas da pele (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; PEREIRA; MEIRELES, 2001).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo reto e pertence à família *Pseudomonadaceae* (TORTORA et al., 2005). Trata-se de umas das espécies mais prevalentes em infecções hospitalares no mundo, e sua importância reside no fato da dificuldade terapêutica ao combate dessas infecções pela espécie possuir características naturais de resistência à diversos antibacterianos (ARRUDA, 1998; BRAGA et al., 2004). A espécie comumente habita a microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e fezes de indivíduos saudáveis, além de estar presente no solo, água, vegetais, cateteres, até mesmo desinfetantes, devido à sua mínima necessidade nutricional (TORTORA et al., 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; STROHL et al., 2004). É considerada um modelo de patógeno oportunista (causa infecções em indivíduos imunodeprimidos) de processos cirúrgicos, pós cateterização urinária, pneumonias após procedimentos de entubação, queimaduras, que podem resultar em doenças bacterianas severas (SARTORI, 2005).

A podridão negra, que é a doença de maior importância em crucíferas, é causada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, e ocorre em todo o mundo (WILLIAMS, 1980). Apesar da doença ter sido parcialmente controlada por cultivares resistentes, ainda apresenta uma ameaça para a agricultura, e métodos mais eficientes precisam ser desenvolvidos (ANDRADE et al., 2005).

Devido ao aumento da resistência dos micro-organismos aos compostos antimicrobianos, é necessária a busca por novas moléculas que possuem ação antagonista.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antimicrobianos produzidos por fungos

Micro-organismos são seres vivos que incluem bactérias, fungos, protozoários, algas e vírus. Apesar de muitos serem responsáveis pelo apodrecimento dos alimentos e por causar algumas doenças e infecções em animais e plantas, a maioria fornece contribuições cruciais para manutenção no nosso ambiente e bem-estar dos seres vivos (TORTORA et al., 2005).

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, responsáveis pela destruição de grande parte da matéria orgânica no planeta e por contribuírem nos ciclos biológicos (FLORENT, 2000). Em 1928, Alexander Fleming observou a formação de uma zona de inibição ao redor de uma colônia de *Penicillium notatum*, que contaminou uma placa de cultura de *Staphylococcus aureus*, sugerindo a produção de uma substância que inibiu o crescimento bacteriano (FERNANDES et al., 2000). A substância em questão foi isolada em 1940 por Howard Florey e Ernst Chain, sendo então o primeiro metabólito fúngico descoberto que atua inibindo o crescimento de outros micro-organismos, sendo denominada Penicilina, droga qual responsável pelo início da “era dos antibióticos” (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 1988; FERNANDES et al., 2000). Iniciou-se a exploração dos micro-organismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, possibilitando o desenvolvimento de novos antibióticos como cefalosporinas, tirocidina, gramicidina, actinomicina, eritromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos (DAX, 1997). De acordo com Rossi e Andreazzi (2005) mais de 20 antibióticos foram descobertos ou sintetizados até a década de 1980.

Segundo Brizuela et al. (1998), os basidiomicetos produzem uma grande variedade de produtos como agentes antimicrobianos, citostáticos, aromas, enzimas reguladoras, componentes estruturais com ação antitumoral e imunologicamente ativos. Os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais importantes produtores desses antibióticos (GUTIÉRREZ et al., 2000).

2.2. Toxinas killer

Algumas leveduras produzem compostos que inibem o crescimento de outras leveduras, micro-organismos procariotos e eucariotos, sem afetar seu crescimento (FUENTEFRÍA, 2004; SENTER, 2010). O fenômeno é conhecido como *killer*, e é uma forma

de competição que se assemelha à produção de bacteriocinas de bactérias (SETER, 2010). Somente *Zygosaccharomyces bailii* é suscetível à sua toxina, embora os fungos produtores da toxina possam ser afetados por toxinas de outras leveduras, e um micro-organismo pode produzir mais que uma micocina diferente (SCHMITT; BREINIG, 2006).

Toxinas *killer*, ou micocinas, são proteínas, glicoproteínas ou glicolipídios que possuem baixa massa molecular, produzidos por leveduras (GOLUBEV, 2006). Estas substâncias atuam como antimicrobianos sobre células sensíveis de outros micro-organismos, através de um mecanismo que inclui receptores de parede com a membrana celular das células sensíveis, embora os mecanismos farmacodinâmicos de interação com procariotos e outros eucariotos não estejam elucidados (GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006). Atualmente o fenótipo *killer* foi relatado em mais de 100 espécies de vinte gêneros distintos, além de várias cepas da mesma espécie, como *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* (GOLUBEV 2006).

O efeito *killer* de leveduras foi observado pela primeira vez em *S. cerevisiae*, por Bevan e Makower (1963). Segundo os autores, determinadas linhagens da espécie foram divididas em três fenótipos: micocinogênicas (ou *killer*), sensíveis e neutras. Quando postas sensíveis e micocinogênicas juntas, a população de sensíveis diminuía. As neutras não secretavam toxinas nem eram afetados pelas micocinogênicas. Descobriu-se que o composto produzido por essas leveduras tratava-se de uma glicoproteína. Apesar das glicoproteínas terem sido descobertas em 1963 (BEVAN; MAKOWER, 1963), as toxinas *killer* glicolipídicas tiveram seu efeito descrito somente trinta anos mais tarde, por Golubev (1992).

O fenótipo micocinogênico tem sido observado em diversos gêneros de fungos dos filos *Basidiomycota* e *Ascomycota*, dentre eles *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowi*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Hansuela*, *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Aureobasidium*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Trichosporon* (WALKER et al., 1995; GOLUBEV et al., 2002; FUENTEFRÍA, 2007; SENTER et al., 2011).

As toxinas *killer* são produzidas por leveduras micocinogênicas, podendo conferir em habitat natural uma vantagem na competição com outros micro-organismos e facilitar o acesso aos nutrientes do substrato, embora seu papel não seja bem elucidado (FREDLUND et al., 2002). De acordo com Fuentefria (2007), sabe-se que a produção do efeito *killer* seja um mecanismo de competição, que pode causar a exclusão imediata de indivíduos sensíveis. As leveduras com esse fenótipo podem ser isoladas de qualquer fonte, embora ocorra com mais frequência em habitats com alta densidade populacional, o qual o processo de competição é

mais intenso, tendo uma função de manutenção da composição da comunidade, excluindo micro-organismos competidores (GOLUBEV et al., 2002; FREDLUND et al., 2002).

A expressão dessas toxinas é influenciada por diversas variáveis, como temperatura, pH e composição química do meio, e concentração celular, sendo, segundo Buzzini et al. (2007), o pH o fator mais importante, ao qual condições ácidas (entre 3 a 6) favorecem mais a produção do antimicrobiano, com um valor ótimo de atividade em 4,5. A temperatura ideal está entre 22°C e 28°C (SCHMITT; BREINIG, 2002). A atividade da toxina decresce em função do tempo, assim como ocorre com bacteriocinas (toxinas procarióticas com aplicação e características moleculares semelhantes), além de serem mais estáveis em meios sólidos do que em líquidos, ao qual a agitação pode causar sua inativação pela alteração das estruturas secundárias proteicas ligadas à porção glicosídica (GOLUBEV, 2006).

As micocinas podem ser divididas em dois grupos: glicoproteínas e glicolipídios, os quais possuem mecanismos de ação diferentes (GOLUBEV, 2006). As glicoproteínas de massa molecular de aproximadamente 1 kDa, também conhecidas por micocinas, são termoestáveis e resistentes a proteases, produzidas em sua maioria por leveduras do grupo basidiomicetos (PUCHKOV et al., 2001). A maioria das micocinas conhecidas pertencem ao grupo das proteínas ou glicoproteínas, com massa molecular de 10-30 kDa, e podem ser codificadas por genes nucleares ou pela associação de componentes RNA fita dupla viral (dsRNA) – transmitida durante divisão celular, fusão, ou esporogênese - ou DNA plasmidial linear fita dupla (dsDNA) (GOLUBEV, 2006). O grupo da glicolipídicas possui a porção proteica ligada a uma porção lipídica, e não a um radical glicosídico (GOLUBEV et al., 2001).

De modo geral, as micocinas possuem o mecanismo de ação determinado por duas fases: a primeira de ligação ao receptor de membrana, e a segunda o efeito específico no meio celular após translocação da toxina (PUCHKOV et al., 2001; GOLUBEV, 2006). Alguns autores propuseram mecanismos dos efeitos específicos na célula, como, inibição da síntese de DNA, aumento da próton-permeabilidade da membrana, com conseqüente rompimento e perda de componentes intracelulares, inibição da síntese de componentes da parede celular, e bloqueio do ciclo celular (SANTOS et al., 2002; SANTOS; MARQUINA, 2004b; GOLUBEV, 2006).

As aplicações biotecnológicas da atividade *killer* vem sendo pesquisadas nos últimos anos. Leveduras com esse fenótipo tem sido estudadas como agentes de biocontrole, antifúngicos, como linhagens iniciadoras de fermentações e marcadores epidemiológicos (FUENTEFRÍA, 2007). Estudos de Santos e Marquina (2004a), testaram a toxina de *Pichia*

membranifaciens CYC1106 como possível agente de biocontrole de *Botrytis cinerea*, um fungo patógeno de plantas herbáceas. *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 produz uma micocina que tem sido testada como biopreservante na superfície de uvas frescas e sucos de uva contra certas espécies de leveduras deterioradoras (CIANI; FATICHENTI, 2001). Lowes et al. (2000) estudaram uma toxina produzida por *Williopsis mrakii*, possuidora de alta estabilidade a pH e temperaturas extremos, possuindo um amplo espectro contra diferentes espécies de leveduras, podendo ser aplicada como agente de biocontrole no processo de fabricação de iogurtes, e demonstrou melhores resultados que os conservantes utilizados usualmente no mercado. A micocina produzida *Zygosaccharomyces bailii* demonstrou melhor atividade antimicrobiana em comparação aos antifúngicos azólicos convencionais, com necessidade de menores concentrações para inibição de fungos patogênicos e fitopatogênicos (WEILER; SCHMITT, 2003). Izgu et al. (2006) estudaram uma toxina secretada por *Pichia anomala*, possuindo um efeito inibitório contra diversas espécies, inclusive *Candida*, e sua caracterização demonstrou uma glicoproteína de 47 kDa, estável em pH de 3 a 5, e temperatura até 37°C.

2.3. O gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* pertence ao Filo *Basidiomycota* do Reino *Fungi*, sub-divisão *Basidiomycotina*, Ordem *Trichosporonales* (MIDDELHOVEN et al., 2004).

Este gênero foi reconhecido em 1890, caracterizando certos fungos causadores de micoses superficiais em humanos (LACAZ et al., 1991). *T. beigelii* foi descrito originalmente da observação clínica de pacientes com nódulos em cabelos e pelos (*Trichos* = pelos, e *sporon* = esporos), e desde a aparição de uma infecção sistêmica causada pelo gênero em 1970, aumentou o número de relatos de doenças causadas por esses fungos (WATSON; KALLICHURUM, 1970). O gênero foi simplificado, tendo duas espécies com relevância clínica, e considerados sinônimos: *T. beigelii* (usado por clínicos) e *T. cutaneum* (usado por micologistas ambientais) (GUÉHO et al., 1992).

A maioria dos *Trichosporon* isolados em humanos eram classificados como *T. beigelii* ou *T. cutaneum*, mas devido à controvérsia da nomenclatura, Guého et al. (1992) propuseram a primeira revisão taxonômica do gênero, e baseando-se na sequência do RNAr, subunidade 26S, e reassociações de DNA reconheceram 19 táxons distintos para o gênero, sendo 13 predominantemente saprofitos (*T. aquatile*, *T. bassicae*, *T. cerebriforme*, *T. dulcimum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. jiroveci*, *T. laibachi*, *T. loubieri*, *T. moniliforme*, *T. montevideense*, *T.*

pullulans, *T. sporotricoides*) e 6 patógenos de humanos. Sugita et al. (1999) reconheceram seis espécies causadoras de infecções em humanos (*T. asahii* e *T. mucoides* envolvidos em infecções profundas, *T. asteroides*, *T. ovoides* e *T. cutaneum* causadores da piedra branca – infecção crônica da cutícula do pelo - e outras infecções superficiais, e *T. inkin* causador de infecções superficiais e profundas). *T. beigeli* foi descaracterizado, sendo que acredita-se que a maioria dos casos atribuídos à espécie foram causados por *T. asahii* (GUÉHO et al., 1994). Rodrigues-Tudela et al. (2005) associam ainda *T. jiirovecii* à infecção em humanos. Há dificuldade em classificar as espécies do gênero por serem muito relacionados filogeneticamente (SUGITA et al., 2001). Segundo Middelhoven et al. (2004) atualmente 37 espécies do gênero são descritas, mais a nova espécie *T. insectorum*, descrita por Fuentefria et al. (2008).

Os fungos desse gênero são leveduriformes, caracterizados pela formação de colônias branco-amareladas, úmidas ou secas, inicialmente de aspecto liso, e com o passar do tempo se torna rugoso ou cerebriformes (Figura 1) (LACAZ et al., 1998). Produz urease, possui pseudo-hifas e hifas hialinas de 2 a 4 x 6 a 9 µm, com septo doliporo em suas hifas, não fermenta carboidrato, embora assimile glicose, sacarose, galactose, maltose, celobiose, trealose e lactose, com presença de blastoconídeos e artroconídeos e sendo sua fase sexuada desconhecida (LACAZ et al., 1998).



Figura 1 - Colônia de *Trichosporon asahii* em meio para fungos CTT 2768 (Fonte: Thaís Shinya).

Essas leveduras estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas no solo, água, ar, vegetais, aves e mamíferos, principalmente em zonas temperadas e tropicais (WOOLLETT; HENDRICK, 1970). Em humanos, fazem parte da microbiota normal do epitélio bucal, da pele, da região perigenital e unhas (ELLNER et al., 1993).

Estes micro-organismos estão associados a um amplo espectro de infecções, desde lesões superficiais benignas, como a piedra branca, a infecções invasivas (SUGITA et al., 1995). *T. inkin* e *T. ovoides*, causadores de infecções superficiais em pelos pubianos e cabelos, respectivamente, *T. cutaneum* e *T. asteroides* responsáveis por infecções cutâneas e *T. asahii* e *T. mucoides* associados às infecções invasivas (SUGITA et al., 1995). A piedra branca, causada por *T. asteroides*, *T. ovoides*, *T. cutaneum* e *T. inkin*, afeta igualmente ambos sexos, e todos grupos etários, embora a genital acometa mais o adulto jovem do sexo masculino (ZAITZ et al., 1998).

Quadros graves com alta mortalidade estão associados à pacientes neutropênicos com câncer, em quimioterapia ou corticosteroides, portadores de neoplasia, transplantados, com próteses valvulares, hemocromatose, ou com AIDS (NESS et al., 1989; SUGITA et al., 2001). Dentre os principais fatores de risco de infecções invasivas podem ser citados neutropenia, uso de corticosteroides, válvula cardíaca, queimadura, uso de cateteres intravenosos, quadros encontrados em pacientes imunocomprometidos (MARTINEZ-LACASA et al., 1991; WALSH et al., 1993).

Infecções superficiais (piedra branca) caracterizam-se por nódulos fúngicos de cor branca ao castanho-claro, mole, de diversas formas e tamanhos, no pelos pubianos, do couro cabeludo, bigode e barba, sendo que o folículo piloso não é afetado, embora os pelos possam se tornar quebradiços, dependendo do tempo de permanência do micro-organismo (GUÉHO et al., 1992; ZAITZ et al., 1998). Muitas vezes assintomáticas, é composta por elementos do fungo compactados facilmente destacados do pelo (GUÉHO et al., 1992). Piedra branca já foi observada em outros mamíferos, como primatas e cavalos selvagens (KAPLAN, 1959). Condições de higiene, hábitos sexuais e fatores sócio-econômicos são determinantes para prevalência da doença segundo Ellner et al. (1993).

Já infecções sistêmicas, tricosporonoses, podem ser disseminada ou localizada, onde as regiões mais atingidas são válvulas cardíacas, feridas cirúrgicas, peritônio e sistema nervoso central (COX; PERFECT, 1999). No caso da disseminada, mais comum, é caracterizada por um estado febril inespecífico, sendo que a infecção progride rapidamente, resultando na falência múltipla de órgãos (COX; PERFECT, 1999).

Segundo Lacaz et al. (2003), *Trichosporon* tem sido um patógeno emergente isolados de infecções ditas nosocomiais, especialmente em paciente imunocomprometidos. O gênero é de fungos considerados oportunistas, devido ao fato da maior parte de infecções estarem ligadas a pacientes imunocomprometidos (PIWOZ et al., 2000). As infecções são frequentes,

fulminantes e espalhadas, com lesões no fígado, pulmões, baço e trato gastrintestinal (RIPPON, 1988).

A formação de hifas durante uma infecção é associada à virulência do fungo (COLLIER et al., 1999), além da produção de enzimas que contribuem no estabelecimento do parasitismo no hospedeiro (GÁCSEK et al., 2007) e de antígenos de parede, também associados à virulência desses micro-organismos (LYMAN et al., 1995).

Trichosporon asahii está presente no meio ambiente (solo, água) e fazem parte da flora normal do trato gastrintestinal e pele (WARNOCK, 1998). O fungo era antes conhecido como *Trichosporon beigeli*, mas a classificação, antes feita por características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, precisou ser redefinida com o auxílio de ferramentas da biologia molecular e estudos filogenéticos (TAPIA, 2009). Por causa da descaracterização do nome *T. beigeli*, acredita-se que a maioria dos casos de infecção atribuídos ao *T. beigeli* ou *T. cutaneum* foram causadas por *T. asahii*, e esta espécie corresponda a 90% das infecções em pacientes imunodeficientes (FAGUNDES JÚNIOR et al., 2008).

A espécie causa infecções em seres humanos, que pode ir desde o acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos graves em indivíduos com imunodepressão (WALLING et al., 1987). *T. asahii* é um importante patógeno oportunista, capaz de causar infecções sistêmicas graves em pacientes imunossuprimidos, oncológicos, hematológicos, e idosos internados em UTI com insuficiência cardíaca grave (FAGUNDES JÚNIOR et al., 2008). Outros fatores de risco têm sido associados à infecção (CHOWDHARY et al., 2004), como, transplante de órgãos, uso de imunossupressores, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (BARCHIESI et al., 1993), queimaduras extensas (HAJJEH; BLUMBERG, 1995), cirurgia cardíaca valvar, corticoterapia (MARTINEZ-LACASA et al., 1991) e uso de cateter venosos (KONTOYIANNIS et al., 2004).

Acredita-se que a espécie seja a mais frequente relacionada a casos invasivos de infecção, seguido por *T. inkin* e *T. mucoides* (MADARIAGA et al., 2003). Dutra (2009), Gargel et al. (2009) e Azevedo et al. (2011) demonstraram a produção de algum composto antimicrobiano por *T. asahii*, o qual inibiu as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus fermentum* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4. O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Sub-filo *Ascomycotina*, classe *Ascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae*, com cerca de 200 espécies catalogadas (SIDRIM; ROCHA, 2004; COOPER, 2011).

A primeira levedura do gênero foi observada em 1839 por Langenbeck, em aftas bucais de um paciente com tifo, e erroneamente considerou-se o micro-organismo como agente etiológico da doença (SIDRIM; ROCHA, 2004). David Gruby, em 1842, classificou esse organismo no gênero *Sporotrichum*, e definiu a candidíase oral, mas Berg, em 1846, estabeleceu a relação dessa levedura com a doença (SIDRIM; ROCHA, 2004). Charles Robin, no ano de 1853, denominou o micro-organismo *Oidium albicans*, nome mudado para *Monilia albicans* por Zopf em 1890, e somente em 1923 Berkhout criou a espécie *Candida albicans*, transferindo a levedura para o gênero *Candida* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os fungos deste gênero podem ser encontrados em diversos ambientes, como água, ar, folhas, solo, alimentos, pasta de dente, roupa, além do corpo humano e de outros animais. As leveduras são pequenas, ovais, com parede fina, que se reproduzem por brotamento (COOPER, 2011).

Esses micro-organismos fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas e pele, podendo eventualmente se tornar patógenos oportunistas, envolvendo unhas, do trato respiratório, digestivo e genital, de regiões mucocutâneas e da pele (RIPPON, 1988; COOPER, 2011). As espécies do gênero têm emergido como agentes de infecções oportunistas em indivíduos imuno-comprometidos, como em pacientes com diabetes avançada, aids, transplantados em terapia imunossupressora e com câncer submetidos à quimioterapia (APERIS et al., 2006). Imunossupressão, uso excessivo de drogas antibacterianas, que suprimem o crescimento de bactérias do trato geniturinário, neoplasias, uso de corticosteroides e drogas citostáticas estimulam o crescimento exacerbado dessas leveduras, resultando em uma grave infecção sistêmica (RIPPON, 1988; TORTORA et al., 2005). De acordo com Rex (1996) o cateter venoso central aparenta ser o fator de risco mais comum para o desenvolvimento de infecções por *Candida* em indivíduos não-neutropênicos ou que não possuem imunodeficiência.

Embora acredite-se que a maior parte dos casos de infecção por *Candida* ocorra via endógena, com o transporte do fungo através do trato digestivo (NUCCI; ANAISSIE, 2001), essas infecções podem ocorrer via exógena, pela via parenteral, contato das mãos de

profissionais da saúde com pacientes e implante de próteses contaminadas (PFALLER, 1995; TROFA et al., 2008).

As formas de candidíase de regiões mucocutâneas são muito comuns, e raramente fatais para indivíduos imuno-competentes. Ao invés disso, são uma preocupação em termos estéticos, e ocasional recaída da doença (COOPER, 2011). Em contraste, a enfermidade em hospedeiros imuno-comprometidos ou com fatores predisponentes (como pacientes com queimaduras) é mais grave, e a infecção sistêmica pode envolver diversos órgãos e gerar uma grande variedade de sintomas (COOPER, 2011).

Até 1963 eram conhecidas cinco espécies do gênero que causavam doenças em humanos: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea*, e esse número aumentou desde então para aproximadamente 20 espécies de *Candida* conhecidas envolvidas em micoses superficiais e invasivas em humanos (DIGNANNI et al., 2003). As infecções mais comuns são causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (KOMSHIAN et al., 1989).

C. albicans, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são as espécies mais importantes de interesse clínico, embora haja um aumento no número de casos relacionados de espécies emergentes como *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, entre outras (COLEMAN et al., 1998)

Como ocorre em diversos outros fungos patogênicos, os do gênero *Candida* apresentam dimorfismo, e existem várias formas clínicas, sendo que o indivíduo pode apresentar mais de uma delas (NEVILLE et al., 2004). O rompimento do equilíbrio biológico entre microbiota e hospedeiro faz com que as espécies de *Candida* provoquem infecções, causando quadros agudo, sub-agudos ou clínicos, profundos ou superficiais (MENEZES; NEUFELD, 2006).

C. albicans está presente na microbiota endógena, e habita intestino, vagina e boca. Entretanto, em determinadas condições como gravidez, diabetes, carências de vitaminas, prematuridade, tratamento com uso prolongado de antibióticos, radioterápicos, corticoides, quimioterápicos, indivíduos imunocomprometidos, uso de próteses cardíacas ou de dentes, essa espécie pode se tornar oportunista, invadir tecidos, e causar infecções superficiais e profundas (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Esta espécie não é facilmente isolada do meio ambiente, e, de acordo com Cooper (2011), essa aparente ausência deve-se à adaptação ao ciclo de vida do parasita com a concomitante perda das propriedades que lhe permitem sobreviver fora de um hospedeiro.

Segundo Sullivan e Coleman (1998), apesar da diminuição de infecções acometidas pela *C. albicans*, a espécie ainda é reconhecida como a mais frequente e patogênica espécie do gênero causadora de infecções em humanos imunocomprometidos ou imunocompetentes.

Em cultivo sob condições e incubação apropriadas, a espécie pode produzir hifas e pseudo-hifas, sendo que *in vivo* ambas as condições (levedura e filamentosa) podem estar presentes (Figura 2) (SUDBERY et al., 2004; COOPER, 2011), sendo na espécie a forma leveduriforme inócua, enquanto a filamentosa patogênica, envolvida com a invasão do tecido (NEVILLE et al., 2004). As hifas geram blastoconídeos em forma de “cachos de uva”, que podem gerar hifas ou crescer como levedura, e a capacidade de formar clamidosporos (células que originam das hifas, que possuem parede espessa) pode ser uma estrutura para diagnóstico da espécie entre o gênero, embora *C. dubliniensis* também produza clamidosporos (COOPER, 2011). Outra característica que, segundo Cooper (2011), serve como diagnóstico para *C. albicans* é a formação do tubo germinativo que ocorre a 37°C.



Figura 2 - Leveduras (à esquerda), pseudo-hifas (centro) e hifas (à direita) de *Candida* spp. (Fonte: www.ec.asg.org)

O desencadeamento da infecção causada por *C. albicans* ocorre pela aderência do micro-organismo à superfície celular, formação do tubo germinativo com consequente desenvolvimento da forma filamentosa, a produção de toxinas e enzimas extracelulares e mudança da variabilidade fenotípica (KWON-CHUNG et al., 1985; MATHEWS, 1994). A produção de fosfolipase por *C. albicans* atua na hidrólise de fosfolipídeos, que dão origem aos lisofosfolipídeos, prejudiciais às células epiteliais (PRICE et al., 1982).

As cepas de acasalamento de *C. albicans* são naturalmente diploides, gerando uma célula-filha tetraploide. A perda de cromossomos durante o crescimento da célula-filha tetraploide assexuada, a fim de reestabelecer um estado diploide, é um fenômeno morfológico geneticamente controlado conhecido como mudança fenotípica (KWON-CHUNG et al., 1985; MATHEWS, 1994; COOPER, 2011).

A grande capacidade de adesão da *C. albicans* e outras leveduras do gênero *Candida* (MATHEWS, 1994; RAMAGE et al., 2005) pode levar também à formação de biofilme, considerado um importante fator de virulência destes micro-organismos, podendo estar presente em todas espécies do gênero (REX, 1996). Os biofilmes conferem maior resistência às drogas antimicrobianas e aos mecanismos de defesa do indivíduo em comparação à células isoladas, favorecem a aderência no tecido, dificultando a fagocitose, se tornando um importante fator de infecção para muitos indivíduos (DONLAN, 2001; VIDOTTO et al., 2002).

A formação do biofilme se inicia com aderência do micro-organismo a um substrato (tecido do hospedeiro ou dispositivo médico), formando uma camada basal de células, que se reproduzem e produzem hifas (SOLL, 2008). Há produção de uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, e finalmente, no estágio final do desenvolvimento do biofilme, há menor multiplicação da levedura e maior crescimento das hifas, e envolvimento do biofilme pela matriz extracelular (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; SOLL, 2008). Embora ainda não seja conhecido o motivo da estimulação da produção da matriz extracelular durante a formação do biofilme, é sabido que alguns dos componentes dessa matriz são carboidratos, fósforo, glicose e proteínas (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Blankenship e Mitchell (2006) ainda incluem um estágio de dispersão de células-filhas, as quais se desenvolvem como células não aderentes, podendo ser liberadas do biofilme.

De acordo com Hube e Naglik (2001), *C. albicans* secreta proteinases e fosfolipases capazes de degradar, transformar ou destruir os constituintes da membrana celular do hospedeiro. As enzimas digerem proteínas do hospedeiro, provendo uma fonte de nitrogênio para o micro-organismo e contribui para adesão e invasão dos tecidos. Estudos de Santana et al. (2010) confirmaram uma alta atividade enzimática de isolados de *C. albicans*.

2.5. O gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pertence à divisão *Deuteromycotina* classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae* (KREGGER, 1984; SCHLOTTFELDT et al., 2002). São 13 as espécies isoladas e descritas segundo Prado et al. (2007) e Guého et al. (2011): *M. caprae* (CABAÑES et al., 2007), *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002), *M. equina* (CABAÑES et al., 2007), *M. furfur* (BAILLON, 1889), *M. globosa* (GUÉHO et al., 1996), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. nana* (HIRAI et al., 2004), *M. obtusa* (GUÉHO et al., 1996), *M. pachydermatis* (WEIDMAN, 1925), *M. restricta* (GUÉHO et al., 1996), *M. slooffiae*

(GUILLOT et al., 1996), *M. sympodialis* (SIMMONS; GUÉHO, 1990) e *M. yamatoensis* (SUGITA et al., 2004). Há entretanto uma nova espécie recentemente reconhecida do gênero: *M. cuniculi* (CABAÑES et al., 2011; GUÉHO et al., 2011).

A classificação taxonômica desse fungo sempre foi muito confusa devido ao seu dimorfismo, existindo nas duas formas, leveduriforme e filamentoso, dependendo das condições da cultura (PROHIC, 2012). No geral, a fase leveduriforme é saprófita, e a filamentosa parasítica (SAADATZADEH et al., 2001), sendo que, originalmente, a fase leveduriforme foi descrita como *Pityrosporum*, enquanto a filamentosa como *Malassezia*, e somente unificadas no gênero *Malassezia* em 1986 (CANNON, 1986).

Malassezia furfur foi a primeira espécie do gênero a ser descrita, por Baillon em 1889, e o nome foi em homenagem à Malassez, que estudou a levedura em 1874 (GUILLOT; BOND, 1999). Durante muitas décadas o gênero *Malassezia* foi limitado às espécies *M. pachydermatis* e *M. furfur* (NASCENTE, 2006). Em 1990, Simmons e Guého descreveram uma nova espécie, *M. sympodialis*, graças ao uso de novas técnicas moleculares (SIMMONS; GUÉHO, 1990). Desde então, outras espécies foram sendo descritas, nessa ordem: *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta* (GUÉHO et al., 1996), *M. dermatitis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. yamatonensis* (SUGITA et al., 2004), *M. nana* (HIRAI et al., 2004), *M. equina* e *M. caprae* (CABAÑES et al., 2007), e recentemente *M. cuniculi* (CABAÑES et al., 2011).

Há divisão do gênero em dois grupos: lipodependentes e não lipodependentes, sendo o segundo grupo formado somente pela *M. pachydermatis* (BARNETT et al., 1990; MARTINS et al., 2004; NASCENTE, 2006). De acordo com Guého et al. (1996), essas leveduras (exceto *M. pachydermatis*) utilizam lipídeos como fonte de carbono, e necessitam da suplementação de ácidos graxos de cadeia longa para seu desenvolvimento, sendo conhecidas como lipofílicas-dependentes. As lipofílicas-não-dependentes são lipofílicas, mas não necessitam dessa suplementação lipídica para seu crescimento normal (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT; BOND, 1999; MACHADO et al., 2003). Segundo Guillot e Bond (1999), *M. pachydermatis* é a única espécie não lipodependente associada a animais, enquanto as lipodependentes são principalmente encontradas em humanos.

As leveduras do gênero possuem uma parede celular espessa, reprodução assexuada por brotamento ou processo monopolar repetitivo, com formação de blastoconídeo, e células ovoides, cilíndricas ou globosas (GUÉHO et al., 2011). A reprodução sexuada ainda não é conhecida, embora um estudo de Xu et al. (2007) identificaram um *locus* do fator de acasalamento em *M. globosa*, o que sugere que esse tipo de reprodução possa ocorrer. As

leveduras desse gênero raramente são encontradas no meio ambiente, sendo parte da flora comensal da pele, e seu principal habitat é primeiramente a pele de muitos vertebrados de sangue quente (MIDGLEY, 2000).

Por causa de sua dependência de lipídeos para sobreviver são encontradas em áreas sebáceas, como face e couro cabeludo (PROHIC, 2012). A colonização por *Malassezia* começa no período neonatal, e aumenta após a puberdade, por causa do aumento de lipídeos na superfície do corpo por causa da maior atividade de glândulas sebáceas neste período (ASHBEE, 2006).

M. pachydermatis foi descrita pela primeira vez em 1925, sob o nome de *Pityrosporum pachydermatis*, isolada de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com eritrodermia (WEIDMAN, 1925). De acordo com Nascente (2006), a espécie *M. pachydermatis* possui células de tamanho entre 1-3 X 2-4 µm, isoladas ou em grupos, com formato oval ou germinação unipolar de base larga, formando uma célula “garrafa”. Hifas e pseudohifas geralmente estão ausentes. As colônias são opacas, com coloração amarelo creme, e à medida que envelhecem passam à cor marrom alaranjado (Figura 4) (GUILLOT et al., 1996).



Figura 3 - Colônia de *M. pachydermatis* (Fonte: Faculty of Life Sciences - University of Copenhagen – Denmark).

Apesar das leveduras do gênero *Malassezia* fazerem parte da microbiota normal de mamíferos, Fraser (1961) concluiu que *M. pachydermatis* poderia causar irritação do epitélio do meato acústico de cães, sendo assim um agente significativo nas otites caninas. Apresentada como colonizadora comum da orelha externa, pele, lábios e orifício anal de cães saudáveis (BOND et al., 1995; KENNIS et al., 1996; NOBRE et al., 2001), *M. pachydermatis* tem sido isolada tanto de cães saudáveis, quanto com dermatite pruriginosa ou otite externa, embora neste último caso apresente um número menor de células visualizadas na microscopia (FRASER,

1965). Devido a esta alta frequência de isolamento dessa espécie em cães não-sadios, a espécie torna-se um invasor patogênico secundário (BOND et al., 1995), e em 1961 associada à otite média e externa em cachorros (FRASER, 1961). Além de Fraser (1961), diversos autores consideram a espécie como associado à otite externa em cães (BAXTER, 1975; GENTILINI et al., 1991; NOBRE et al., 2001).

M. pachydermatis está associada à dermatite e otite em animais de sangue quente, em especial cães e gatos (ABOU-GABAL et al., 1979; GUILLOT; BOND, 1999), e pode causar dermatite em rinocerontes (WEIDMANN, 1925). Apesar de a espécie estar mais adaptada aos animais, ela pode ser encontrada em humanos, onde podem se tornar responsável por algumas infecções sistêmicas, principalmente em crianças recém-nascidas internadas em unidades de tratamento intensivo (WELBEL et al., 1994; AKERSTEDT; VOLLSET, 1996; DWORECKA-KASAK; TOKA, 1999). *M. pachydermatis* também foi associada à infecção sistêmica febril em humanos com infecções em diversos órgãos, incluindo fígado (GUÉHO et al., 1987), e *Malassezia* spp. foi isolada do fluido de diálise de adultos com peritonite recorrente (SIDRIM; ROCHA, 2004).

De acordo com Bond (1997), podem ser citados como fatores de sobrevivência e virulência de *M. pachydermatis* a produção de enzimas que alteram o manto lipídico cutâneo, causando inflamação local e consequente ativação do complemento com posterior penetração da espécie nos tecidos, além de sua aderência aos queratinócitos, alterando a coesão entre essas células e consequentemente danificando a queratina.

Fatores que alteram o microclima local, fornecendo temperatura, umidade e substrato, aumentam o número de células desta espécie, fazendo-a passar da forma comensal à patogênica (FRASER, 1965; LARSON et al., 1988). A apresentação clínica da otite externa só ocorre com a presença numerosa de células de *M. pachydermatis* por campo, onde a proliferação de células da levedura desencadeia alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro, alterando o equilíbrio comensal-hospedeiro (GRIFFIN, 1996; BOND et al., 1996). A perpetuação da espécie é facilitada, de acordo com Lobell et al. (1995), pela utilização de antibacterianos que eliminam bactérias comensais competidoras, e a resistência de *M. pachydermatis* às drogas antifúngicas se deve ao uso indiscriminado das mesmas (EICHENBERG et al., 2003).

2.6. O gênero *Trichophyton*

Fungos considerados dermatófitos são fungos queratinofílicos capazes de causar doenças em homens e animais, sendo que as espécies pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (CABAÑES, 2000; TRABULSI et al., 2002; SIDRIM et al., 2004; TORTORA et al., 2005; OUTERBRIDGE, 2006). De acordo com Hoog et al. (2000), esse grupo de fungos pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Euascmycetes* e ordem *Onygenales*. Entretanto, Hibbett et al. (2007), com uma recente classificação do Reino *Fungi*, classificam como filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae* e ordem *Onygenales*.

Existem cerca de 40 espécies incluídas nesses três gêneros, mas o número de dermatófitos verdadeiros (fungos queratinofílicos capazes de causar doenças em animais e humanos) reduz a 30 espécies dentro dos gêneros, e por causa das diferentes condições climáticas, geográficas e socioeconômicas, há diferentes padrões de distribuição dos dermatófitos pelo mundo (LACAZ et al., 1998; CABAÑES, 2001).

O grupo dermatófitos é composto por fungos filamentosos, com hifas septadas, hialinos, queratinofílicos, algumas vezes artroconidiados, capazes de colonizar e causar lesões clínicas em pelos e/ou extrato córneo, sendo que a classificação dos dermatófitos nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* ocorre de acordo com sua reprodução assexuada (ELEWSKI, 2000; SIDRIM et al., 2004; OUTERBRIDGE, 2006). A taxonomia e identificação rotineira em laboratório baseia-se em critérios morfológicos, macro e microscópicos e reprodução assexuada (CABAÑES, 2001). Geralmente suas colônias apresentam cores claras, com uma gama restrita a tons esbranquiçados, marrom e amarelados, sendo raras as colônias em outras cores (CABAÑES, 2001)

A caracterização microscópica dos dermatófitos ocorre de acordo com seus conídios assexuados. Enquanto no gênero *Epidermophyton* os microconídios são ausentes, no gênero *Trichophyton* eles são numerosos, arredondados, unicelulares de parede fina, isolados ou em cachos ao longo da hifa, e no gênero *Microsporum* são unicelulares e raros ao longo das hifas. Quanto aos macroconídios, *Epidermophyton* apresenta-os de forma numerosa, formando cachos de uva, com parede fina e septos que os dividem em duas a três células, *Microsporum* apresenta-os de forma numerosa, fusiformes, com parede rugosa e fina, e de três a quinze septos, e *Trichophyton* raramente apresenta-os, e possuem parede fina e lisa, com formato alongado ou em clava (ZAITZ; PROENÇA, 1988).

Diversos autores agrupam os dermatófitos de acordo com sua preferência pelo hospedeiro e habitat natural em zoofílicos, geofílicos ou antropofílicos (JONES et al., 2000). Quando infectam principalmente seres humanos são considerados antropofílicos, o caso das espécies *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* e *Epidermophyton floccosum*. Já os zoofílicos afetam basicamente animais, podendo usualmente infectar humanos (*Microsporum canis*, *M. gallinae*, *M. nanum*, *M. persicolor*, *T. equinum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. verrucosum*). Finalmente, os geofílicos, como *M. gypseum*, *M. fulvum*, *T. ajelloi* e *T. terrestre* são, sobretudo, saprófitas do solo e ocasionalmente infectam tanto animais quanto humanos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; SANTOS et al., 1997; CABAÑES, 2001; COSTA et al., 2002; MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006).

A dermatofitose é uma doença cutânea contagiosa, causada pelos fungos dermatófitos, que apresentam capacidade de invasão de tecidos queratinizados de animais e humanos, podendo afetar assim pelos, unhas, penas, cascos, chifres e células queratinizadas da pele (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; PEREIRA; MEIRELES, 2001). A enfermidade pode ser transmitida facilmente de uma espécie de animal para outra, bem como de animais para os homens, e ocasionalmente do homem aos animais (RICHARD et al., 1994), e é caracterizada por descamações locais, lesões circulares e alopecia multifocal (CAFARCHIA et al., 2006; DeBOER; MORIELLO, 2006).

De acordo com Cabañes (2001) as espécies mais frequentes encontradas nos laboratórios de micologia clínica humana são: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*, responsáveis por mais de 90% dos casos de dermatofitose em humanos.

A prevalência dos dermatófitos varia nas diversas regiões globais, inclusive dentro do mesmo país, uma vez que fatores socioeconômicos e higiênicos da população, urbanização, clima, sistema imunológico do hospedeiro, ações terapêuticas e características do fungo geram diferenças nos padrões de distribuição desses fungos (LACAZ et al., 1998). A gravidade da infecção varia mais de acordo com estado do sistema imune, a sensibilidade do hospedeiro ao tratamento, sexo, local da infecção e fatores ambientais locais do que com a virulência ou linhagem do fungo, podendo se manifestar moderadamente ou de forma severa (MORAES et al., 2001).

As manifestações clínicas mais comuns das dermatofitoses são as cutâneas, sob nome genérico de “tinhas” (do latim *tinea*), sendo classificadas de acordo com a localização

anatômica da micose: “tinha” do couro cabeludo (*tinea capitis*), da barba (*tinea barbae*), corporal (*tinea corporis*), das unhas (*tinea unguium*), dos pés (*tinea pedis*) e mãos (*tinea manuum*), e da região inguinal (*tinea cruris*) (MORAES et al., 2001; ANDREWS; BURNS, 2008). Em raras ocasiões, os dermatófitos invadem camadas mais profundas não queratinizadas, onde despertam uma resposta aguda, formando abscessos que podem originar inflamações granulomatosas (MORAES et al., 2001). Segundo Chermette et al. (2008) e DeBoer e Moriello (2006) esses micro-organismos são transmitidos entre humanos e/ou animais através de contato direto, com pelos, escamas ou crosta infectadas no ambiente, ou por contato indireto através de fômites.

Sidrim et al. (2004) descreveram a instalação do processo patogênico na pele, a qual inicia-se pela inoculação artoconídeo ou de um fragmento de hifa depositado na pele, geralmente através de uma lesão cutânea ou escoriação pré-existente. A produção das enzimas proteolíticas queratinases, elastases e colagenases também são fatores responsáveis pela instalação da infecção (SIDRIM et al., 2004).

A micose nos pelos ocorre secundariamente à invasão da pele. Após invadir a camada córnea da epiderme (camada mais superficial da pele) o micro-organismo encontra uma região de orifício piloso, e se aprofunda na direção do infundíbulo do pelo, que é uma nova fonte de queratina, sendo que essa progressão só termina quando não houver mais queratina no coleto do bulbo capilar (SIDRIM et al., 2004)

Na micose em unhas, a infecção também ocorre secundariamente à penetração do dermatófito na camada córnea da porção distal do leito ungueal, sendo que a penetração do micro-organismo na unha previamente doente, e diferentemente das onicomicoses causadas por leveduras, a invasão começa na parte distal em direção a parte proximal da unha e não na prega proximal (SIDRIM et al., 2004).

Como esses fungos raramente invadem o tecido, o mecanismo de desencadeamento da doença ocorre pela liberação de toxinas ou alérgenos, que penetram na derme e epiderme, provocando uma reação inflamatória (SCOTT; HORN, 1987; SCOTT et al., 2001). Há alguns grupos de risco, como crianças, portadores de câncer, pacientes transplantados, doenças imunossupressoras, idosos, as quais possuem maior chance de contrair infecções, as quais podem ser mais graves (KING et al., 1996)

Trichophyton mentagrophytes é a segunda ou terceira maior causa de dermatofitose no ser humano, ocasionando quadros de onicomicoses, lesões no couro cabeludo, epidermofitíases e lesões interdigitoplantares. Existem duas principais variedades de *T. mentagrophytes*: *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. mentagrophytes* var.

interdigitale, sendo que a primeira é uma espécie zoofílica, e a segunda espécie particularmente antropofílica. As duas variedades também podem ser diferenciadas fenotipicamente, onde, cultivadas em ágar Sabouraud, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* apresenta textura pulverulenta, sem relevo acentuado, com coloração que varia do branco – amarelado ao castanho – avermelhado e o reverso da colônia apresenta um pigmento que pode ir do castanho ao vinho, e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* manifesta colônias aveludadas (cotonosas), com coloração branco – avermelhada, e reverso pouco pigmentado castanho ou avermelhado (CABAÑES, 2001; SIDRIM et al., 2004; KAUFMAN et al., 2005).

Segundo Cabañes (2001) e Sidrim et al. (2004), as colônias de *T. mentagrophytes* possuem grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados com aspecto de cacho (Figura 4). Quanto aos macroconídios, quando presentes, possuem forma de “charuto cubano”, com um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas e septadas. Os autores ainda citam a grande quantidade de estruturas de ornamentação, como hifas espiraladas, em raquete, clamidoconídios intercalares e órgãos nodulares.



Figura 4 - Colônia de *T. mentagrophytes* (à esquerda) e macroconídeos e microconídeos típicos de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (à direita) (Fonte: Cabañes, 2001).

Estudos de Hirsch e Zee (2003) demonstram que para o tratamento de algumas espécies desses fungos é necessária a utilização relativamente grande da concentração de determinados fungicidas, que causam efeitos maléficos ao animal ou ser humanos infectados.

2.7. O gênero *Xanthomonas*

O gênero de bactérias *Xanthomonas* pertence ao filo das Proteobacterias, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Xanthomonadales*, família *Xanthomonadaceae*, e inclui

aproximadamente 27 espécies, todas fitopatogênicas, exceto *X. maltophilia* (SUTHERLAND, 1993; GARCIA-OCHOA et al., 2000; GARRITY; HOLT, 2000; MADIGAN et al., 2010).

A taxonomia do gênero é complexa e tem sofrido diversas alterações. No início as espécies de *Xanthomonas* eram classificadas em outros gêneros, como *Pseudomonas* e *Bacterium*, e somente em 1939 Dowson propôs a criação do gênero *Xanthomonas* (BRADBURY, 1986). A classificação realizada para organizar novas espécies com o conceito novo hospedeiro – nova espécie foi utilizada até 1974, gerando um gênero complexo com mais de 100 espécies (VAUTERIN et al., 1995). Vauterin et al. (1995) realizaram um estudo de hibridação DNA-DNA, e fizeram algumas mudanças taxonômicas no gênero, sendo estabelecido que os isolados de crucíferas deveriam ser classificados na espécie *Xanthomonas campestris*, e reclassificou o gênero em 20 espécies. Atualmente são validadas 27 espécies, sendo elas: *X. albilineans*, *X. alfafae*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. citri*, *X. codiae*, *X. cynareae*, *X. ervisicatoria*, *X. fragariae*, *X. fuscans*, *X. gardineri*, *X. hortorum*, *X. maltophilia*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. perforans*, *X. phaseoli*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vesicola*, *X. vesicatoria*, sendo que dentro das espécies podem existir diversos patovares (BAJPAI et al., 2011).

As espécies do gênero são muito semelhantes fisiologicamente e morfológicamente, sendo bacilos retos ou levemente curvados, Gram-negativos com dimensões entre 0,7 - 2 µm de comprimento e 0,4 – 0,7 µm de largura, quimiorganotróficos e aeróbios obrigatórios, utilizando o oxigênio como receptor final de elétrons, e possuem um único flagelo polar (1,7 - 3 µm de comprimento), que promove sua motilidade (GARCIA-OCHOA et al., 2000; MEYER; BOGDANOVE, 2009; MADIGAN et al., 2010). A cultura da maioria das espécies é de colônias amarelas, graças à produção de carotenoides (xantomonadinas), de aspecto liso, brilhante e viscoso, por causa da produção do exopolissacarídeo xantana, que confere vantagem na patogenicidade, oferece proteção contra congelamento, dessecação e radiação UV (Figura 5) (BRADBURY 1986; MEYER; BOGDANOVE, 2009).



Figura 5 - Colônia de *Xanthomonas* spp. (Fonte: www.apsnet.org)

A agricultura mundial é afetada por inúmeras doenças ocasionadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*, o que causa perdas substanciais em culturas de grande importância econômica (FILGUEIRA, 2000). Segundo Chan e Goodwin (1999), as espécies do gênero podem provocar doenças em pelo menos 124 espécies de plantas monocotiledôneas e em 268 espécies de dicotiledôneas, embora cada espécie de *Xanthomonas* possua um leque restrito de plantas hospedeiras. As fitopatologias causadas possuem diversos sintomas, entre eles necrose, cancro, ferrugem e manchas, e podem atacar diversas partes da planta, como folhas, caule e frutas (LEYNS et al., 1984; HAYWARD, 1993).

A podridão negra, que é a doença de maior importância em crucíferas, é causada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, e ocorre em todo o mundo, podendo causar sérios danos às culturas nos períodos de chuva (WILLIAMS, 1980). As plantas da família Cruciferae/Brassicaceae são as mais numerosas de espécies olareáceas, destacando-se a couve-flor, couve-manteiga, o brócolis, rabanete, nabo e o repolho (FILGUEIRA, 2000). Segundo Osbourn (1995), *X. campestris* produz diversas enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular de vegetais, como proteases, endogluconases, pectinases, bem como polissacarídeos, sendo a xantana o mais importante.

A maior intensidade da podridão negra ocorre em períodos com alta umidade e temperaturas entre 28°C a 30°C (ASSIS et al., 1996). O micro-organismo penetra nas plantas através dos estômatos, colonizando os espaços intercelulares do mesófilo, ou pelos hidatódios e feridas, colonizando o vegetal pelo sistema vascular (MANNERS, 1993; QIAN et al., 2005). As folhas das plantas infectadas apresentam lesões com clorose em forma de V, com o vértice voltado para o centro foliar, nervuras necrosadas ao longo de sua margem, e com o passar do tempo há aumento dessas lesões e eventual queda. Os caules apresentam necrose dos feixes vasculares (QIAN et al., 2005), e o patógeno pode penetrar no sistema vascular, e infectar

toda a planta, produzir a xantana que obstrui as veias do xilema, o que impedirá o fluxo da água no vegetal (WILLIAMS, 1980) (Figura 6).



Figura 6 - Podridão-negra em folha de couve, com lesão em forma de “v”, com amarelecimento do tecido (Fonte: www.ohioline.osu.edu)

A bactéria é transmitida através das sementes principalmente, que constitui uma importante fonte de inóculo primário, pois poderá dar início ao ciclo da doença e de mudas contaminadas (RODRIGUES NETO, 1995). O solo, as plantas infectadas, a água, também dispersam a bactéria, contribuindo para a ocorrência da podridão negra (ZHAO et al., 2002).

A utilização de sementes isentas da bactéria, rotação de culturas, remoção de ervas daninhas, controle de insetos, cuidados durante o processo de colheita e acondicionamento e as manipulações culturais e destruição de resíduos remanescentes pós-colheita ajudam no controle da doença (ZHAO et al., 2002). Embora o uso de pesticidas e antibióticos seja a principal forma de controlar fitodoenças, essas medidas geram alta toxicidade residual, bem como acúmulo de tóxicos ao longo da cadeia trófica, além do aparecimento de microorganismos resistentes (SATISH et al., 1999; VASINAUSKIENE et al., 2006). Cultivares resistentes também vêm sendo utilizados também como forma de controle da podridão-negra, embora a doença ainda represente uma ameaça para a agricultura, e haja necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes e com menores riscos ambientais para o controle de *X. campestris* (ANDRADE et al., 2005).

X. campestris pv *campestris* possui também sua importância industrial. O microorganismo em questão é responsável pela produção do polissacarídeo xantana, uma goma hidrossolúvel de alto peso molecular (JANSSON et al., 1975; GALINDO, 1994; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Sua propriedade reológica superior em relação à de outros polissacarídeos microbianos e facilidade em sua obtenção fazem com que esse biopolissacarídeo seja amplamente utilizado nas indústrias, sendo considerado o polissacarídeo bacteriano comercialmente mais importante (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Na indústria de alimentos é muito utilizada principalmente pela sua ampla gama de compatibilidade com ingredientes de alimentos e aditivos (CHALLEN, 1994), sendo compatível com lipídios, proteínas e outros polissacarídeos (SUTHERLAND, 1998), pela sua estabilidade em diferentes pHs, fácil dissolução em água (SUTHERLAND, 2001) e necessidade de baixa concentração da goma sem afetar no sabor do produto final (ROSALAM; ENGLAND, 2006). É encontrada como espessante e emulsificante em misturas secas para sobremesas, recheios, molhos, xaropes, bebidas, sorvetes entre outros (KATZBAUER, 1998).

O uso da xantana não é restrito somente à indústria alimentícia. Em poços de petróleo é usada para recuperação de petróleo, por não ser sujeita à degradação por cisalhamento e temperatura e ter uma excelente compatibilidade com sais (VUYST et al., 1987; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Na indústria de cosméticos é usada em géis e cremes proporcionando maciez e suavidade devido à sua pseudoplasticidade, em produtos farmacêuticos é usada em emulsões ou suspensões, em produtos de higiene é utilizada em xampus e cremes dentais (KATZBAUER, 1998), é usada também na indústria de papel e papelão para alimentos e como estabilizante de alimentação bovina, de herbicidas, fertilizantes e fungicidas (MORRIS, 1995).

2.8. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero de bactérias *Pseudomonas* pertence ao filo das Proteobacterias, classe Gammaproteobacteria, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonaceae* (MADIGAN et al., 2010). A classificação taxonômica do gênero, descrito pela primeira vez há mais de cem anos, sofreu sua primeira revisão por Stanier et al. (1966). O autor baseou-se nas características bioquímicas e nutricionais dos micro-organismos, dividindo o gênero em quatro grupos: pseudomallei, alcaligenes, acidovorans e fluorescente. Palleroni et al. (1972) através de estudos de homologia DNA-rRNA verificaram uma grande heterogeneidade entre os grupos, causando uma reclassificação do gênero em cinco grupos geneticamente distintos entre si. Finalmente, em 1996, Kersters et al. classificaram os grupos nos novos gêneros: *Pseudomonas* (Grupo I), *Burkholderia* (Grupo II), *Comamonas* (Grupo III), *Brevundimonas* (Grupo IV), *Stenotrophomonas* (Grupo V), além das espécies *Cryseomonas luteola*, *Flavimonas orxyhabitans* e *Shewanella putrefaciens*, que ficaram num grupo sem classificação (KONEMAN et al., 2001). O gênero *Pseudomonas* inclui as espécies *P.*

aeruginosa, *P. fluorescens*, *P. putida*, *O. veronii*, *P. monteilli*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola* e *P. oryzihabitans* (KONEMAN et al., 2001).

Pseudomonas é um gênero de bactérias gram-negativas, que apresentam-se como bacilos retos ou ligeiramente curvados, de 0,5-0,7 µm de espessura por 1,5-3,0 µm de comprimento, não esporuladas, móveis por um ou mais flagelos polares e não fermentador, aeróbios estritos utilizando assim o oxigênio como aceptor final de elétrons (KONEMAN et al., 2001; KISKA; GILLIAN, 2003; TORTORA et al., 2005). Como patógenos oportunistas de animais e planta, o gênero se destaca dentro da família, sendo *P. aeruginosa* a representante de em média 75% dos isolados de amostras clínicas (KISKA; GILLIAN, 2003).

P. aeruginosa produz os pigmentos pioverdina (fluorescente) e piocianina (azul), que conferem ao meio uma cor verde brilhante (Figura 7), característica da espécie, sendo que algumas cepas podem também produzir outros pigmentos como piomelanina (marrom a preto) e piorrubina (avermelhado) (POLLACK, 2000; MERINO, 2007). São citocromo-oxidase positiva, e móveis através de flagelo monotríquio polar, apresentam colônias de características variadas, possuindo ou não um odor característico de frutas cítricas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).



Figura 7 - Colônia de *P. aeruginosa* (Fonte: Gary E. Kaiser - <http://faculty.ccbcmd.edu>).

A espécie comumente habita a microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e fezes de indivíduos saudáveis, além de estar presente no solo, água, matéria orgânica em decomposição, vegetais, cateteres, até mesmo desinfetantes, devido a pouca exigência para seu crescimento e grande versatilidade nutricional (KISKA; GILLIAN, 2003; TORTORA et al., 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; STROHL et al., 2004).

O micro-organismo em questão é uma das espécies mais prevalentes em infecções hospitalares no mundo, e sua importância reside no fato da dificuldade terapêutica ao combate

dessas infecções pela espécie possuir características naturais de resistência (ARRUDA, 1998; BRAGA et al., 2004). É considerado um modelo de patógeno oportunista (causa infecções em indivíduos imunodeprimidos) de processos cirúrgicos, pós cateterização urinária, pneumonias após procedimentos de entubação, queimaduras, que podem resultar em doenças bacterianas severas (SARTORI, 2005).

2.8.1. Infecções causadas por *P. aeruginosa*

As infecções causadas por esse micro-organismo compreendem desde infecções superficiais na pele à septicemia fulminante (KISKA; GILLIAN, 2003). *P. aeruginosa* pode colonizar orofaringe, pele e intestino de indivíduos saudáveis, embora esteja associada a doenças em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados (KISKA; GILLIAN, 2003). De acordo com Pollack (2000), o início da infecção ocorre com a quebra da barreira anatômica, como utilização de processos invasivos. Quando acometem seres humanos imunocompetentes, a infecção por *P. aeruginosa*, adquirida na comunidade através principalmente da água e soluções, costumam ser localizadas, como é o caso de infecções oculares decorridas de lentes de contato contaminadas (CHOY et al., 2008) e de otite externa e foliculite em nadadores (MENA; GERBA, 2009).

A disseminação no ambiente hospitalar é favorecida pela facilidade do micro-organismo em crescer em diversos materiais inertes, como materiais e equipamentos hospitalares, bem como sua habilidade em manter-se viável nas mãos dos profissionais da saúde (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). A baixa exigência nutricional faz com que a espécie consiga crescer em qualquer superfície (TORTORA et al., 2005) e a formação de biofilmes permite a colonização em cateteres, tubos, e diversos materiais disseminando e dificultando o controle da bactéria (KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, 1991).

A espécie é um importante patógeno em infecções dos tratos urinário e respiratório (CORREIA et al., 2007; PITOUT et al., 2007), é o sexto micro-organismo mais comum em infecções da corrente sanguínea (GAYNES; EDWARDS, 2005), pode causar meningite (NAIJA et al., 2004), endocardite (KATO et al., 2009), infecções nos ossos (STANZANI et al., 2007), bacteremias e infecções de feridas (KISKA; GILLIAN, 2003).

Alguns indivíduos possuem condições que podem ser determinantes para infecções causadas por *P. aeruginosa*, como: câncer e diabetes (CHATZINIKOLAOU et al., 2000), fibrose cística (DORING et al., 2000), idade avançada (CAO et al., 2004), tempo prolongado de internação, internados em unidades críticas (AGODI et al., 2007), procedimento invasivos

e uso prévio de drogas anti-pseudomonas (FALAGAS; KOOPTERIDES, 2006; LODISE et al., 2007).

2.8.2. Fatores de virulência

A espécie é conhecida por possuir diversos mecanismos de virulência. Dentre esses fatores pode ser citada a presença dos *pilli*, que são apêndices da superfície celular, promotores da aderência do micro-organismo aos receptores presentes nas células do epitélio do hospedeiro e conseqüentemente da colonização de superfícies epiteliais (IRVIN et al., 1989; BONE, 1993). A presença do flagelo, também se faz importante na adesão do micro-organismo (BONE, 1993).

Essa espécie também produz excessivamente um polímero de polissacarídeo capsular denominado alginato, que envolve a célula dando-a uma aparência mucóide, permitindo a aderência às superfícies epiteliais e promove uma resistência parcial aos mecanismos de defesa do hospedeiro (MAI et al., 1993; HEAD; YU, 2004). Esse fator é largamente produzido por cepas de *P. aeruginosa* responsáveis por infecções pulmonares em indivíduos com fibrose cística, e ajudam na formação dos biofilmes (HEAD; YU, 2004).

A formação de biofilmes por *P. aeruginosa* também é um importante fator que contribui com a colonização e infecção. De acordo com Hogardt et al. (2004), são complexos formados com mini colônias do micro-organismo, envolto por uma matriz orgânica de polímeros e componentes celulares que aderem à qualquer superfície, dificultando assim a ação do sistema imune do hospedeiro e antibióticos. Além do mais, um sistema de comunicação celular através de estímulos químicos (*Quorum sensing*) parece emitir sinais entre as estruturas bacterianas, protegendo assim o biofilme (SKINDERSOE et al., 2008).

Outro fator de virulência importante é a endotoxina (lipídeo A) presente no lipopolissacarídeo – LPS – (Figura 8), da parede celular, que através da ativação e liberação de mediadores com função de vasodilatação (interleucina 1 - IL-1 -, e fator de necrose tumoral - TNF), ativação do complemento e coagulação intravascular disseminada, causa a síndrome do choque séptico (febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anomalias metabólicas) (BONE, 1993; KURAHASHI et al., 1999).

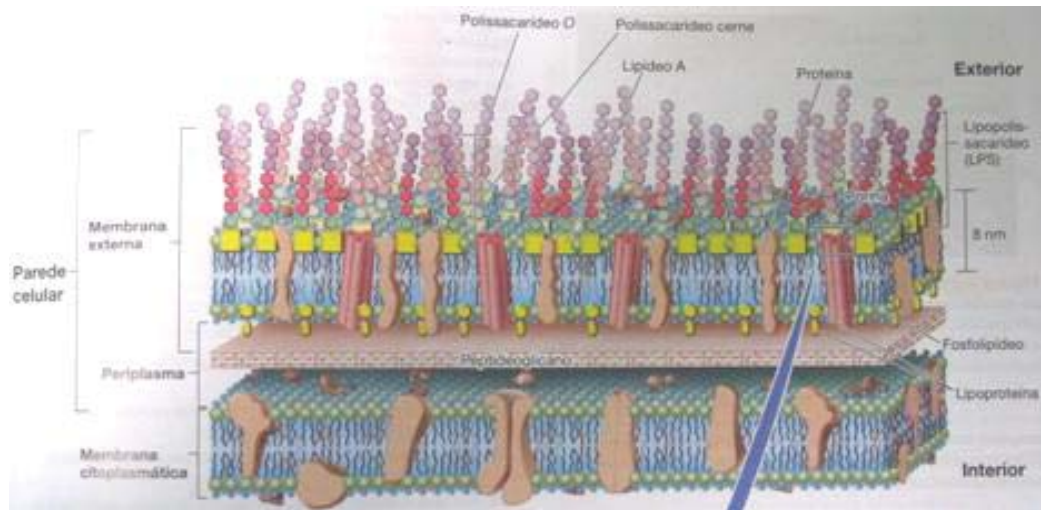


Figura 8 - Parede celular de bactérias Gram-negativas (Fonte: Madigan et al., 2010).

Outros fatores de virulência de *P. aeruginosa* são: a produção da exotoxina A que mata as células eucarióticas pela inibição da síntese protéica, podendo causar necrose de tecidos moles, choque séptico, e interrompe a atividade celular e resposta do macrófago; enterotoxinas, que interrompem a atividade gastrointestinal normal, causando diarreia; exoenzima S, que possui função de adesina, além de inibir a síntese proteica; produção de elastase e protease alcalina, que contribuem para aderência do patógeno, além de serem capazes de degradar elastina, colágeno e laminina, clivar imunoglobulinas G e A (IgG e IgA) e inativar os componentes do complemento; fosfolipase C, que destrói a membrana citoplasmática, o surfactante pulmonar e inativa opsoninas; piocianinas que impedem o crescimento de outras bactérias além de eliminar a atividade ciliar da mucosa respiratória; produção de leucocidina, capaz de inibir a função de neutrófilos e linfócitos; neuraminidase, que ajudam na aderência celular (POLLACK, 1983; JAFFAR-BANDJEE et al., 1995; FORBES et al., 1998; SAWA et al., 1998; KONEMAN et al., 2001; MITCHELL et al., 2006).

2.8.3. Fatores de resistência de *P. aeruginosa*

P.aeruginosa possui diversos fatores de resistência aos antimicrobianos, fazendo com que a espécie não seja suscetível à grande parte dos β -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, a maioria dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (LI et al., 1994). O micro-organismo possui facilidade em adquirir resistência através de fenômenos de mutação, conjugação, transposição e indução, que somados ao uso indiscriminado de medicamentos e aos fatores naturais de

resistência da bactéria diminuem a gama de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (HANCOCK, 1998). Dentre os principais mecanismos de resistência podem ser citados a baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de β -lactamases (LI et al, 1994).

2.8.3.1. Mecanismos de resistência adquirida

A resistência adquirida pode ser mediada por: bomba de efluxo, produção de β -lactamase e redução da permeabilidade da membrana, sendo que a transmissão dos genes de resistência pode ocorrer através de integrons, transposons e plasmídeos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

2.8.3.2. Permeabilidade da membrana externa

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa constituída por uma dupla camada de lipopolissacarídeos (LPS), com a porção lipídica voltada para a parte interna, sendo pouco permeável a solutos hidrofílicos, como muitos nutrientes e alguns fármacos (MADIGAN et al., 2010). Para o transporte de substâncias pelo espaço periplasmático e posteriormente para o interior da célula, são utilizados canais proteicos (porinas) constituídos por subunidades que se agrupam formando poros por onde moléculas são difundidas seletivamente, impedindo a entrada de muitos antimicrobianos (NIKAIDO, 2003).

As porinas presentes na membrana de *P. aeruginosa* são OprC, OprD, Por e OprF, sendo a última a maior e mais abundante (MCPHEE et al., 2009). OprF é uma porina inespecífica – utilizada por vários tipos de substâncias, incluindo os antibióticos – que possui a capacidade de lenta difusão das substâncias através de seu canal, auxiliando na resistência intrínseca à alguns antimicrobianos (LIVERMORE, 2001).

A porina OprD trata-se de uma porina específica, utilizada pelo imipenem para entrar na célula (TRIAS; NIKAIDO, 1990; LIVERMORE, 2001). Já a porina OprE é utilizada pelas cefalosporinas e quinolonas como mecanismo de passagem através da membrana externa (YAMANO et al., 1990; LIVERMORE, 2001). Portanto, a perda dessas porinas leva à resistência ao imipenem, diminuição da sensibilidade ao meropenem, e resistência à cefalosporinas e quinolonas (TRIAS; NIKAIDO, 1990; YAMANO et al., 1990; LIVERMORE, 2001). A mutação que leva à perda dessas porinas não afeta na viabilidade

da célula por serem específicas aos antibióticos, e não promovem a entrada de substâncias essenciais (TRIAS; NIKAIDO, 1990).

Além das porinas, a membrana externa de micro-organismos Gram-negativos possui bombas de efluxo, que são sistemas constituídos proteínas de ligação e uma transportadora, que atuam expulsando compostos tóxicos à célula, inclusive antimicrobianos (LI et al., 2000). Porinas e bombas de efluxo atuam concomitantemente, reduzindo a concentração de antimicrobianos dentro a célula (LIVERMORE, 2001). Para *P. aeruginosa* 6 bombas de efluxo foram caracterizadas, sendo que sabe-se da existência de mais 6 genes que codificam outras bombas: MexAB-OprM (POOLE et al., 1993; MASUDA et al., 2000), MexCD-OprJ (POOLE et al., 1996; MASUDA et al., 2000), MexEF-OprN (KOHLENER et al., 1997; MASEDA et al., 2000), MexXY-OprM (MINE et al., 1999; MASUDA et al., 2000), MexJK-OprM (CHUANHUEN et al., 2002) e MexGHI-OpmD (AENDEKERK et al., 2002). Os sistemas de efluxo são denominados Multiple Drugs Resistance (MDR) e podem ser de largo espectro ou ser específico de um droga (OKAMOTO et al., 2001).

As bombas de efluxo são baseadas na abertura de um canal que possui uma ligação com o interior celular e o meio extracelular (LIVERMORE, 2002). O sistema possui três proteínas: uma transportadora que depende de energia, a bomba, que está localizada na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF, MexY, MexK e MexI), uma que facilita a passagem da substância através da membrana externa (OprM, OprJ, OprN, OpmD) e uma terceira que tem o papel de ligar as outras (MexA, MexC, MexE MexX, MexJ e MexGH) (LIVERMORE, 2002).

A bomba de efluxo mais descrito na espécie é a MexAB-OprM. Esse sistema é o responsável pela expulsão de cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, e meropenem, sendo que imipenem e aminoglicosídeos não são afetados (JALAL et al., 2000; LIVERMORE, 2001)

Já a bomba MexCD-OprJ expulsa eritromicina, tetraciclina, quinolonas, cloranfenicol, cefoperazona e ceftazidima, e o sistema MexXY é responsável pela expulsão de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrolídeos e tetraciclina (MASUDA et al., 2000). MexEF-OprN aumenta a resistência a quinolonas e carbapenems (MASEDA et al., 2000), MexJK funciona como efluxo de eritromicina e tetraciclina através da proteína OprM (CHUANHUEN et al., 2002) e finalmente MexGHI-OpmD confere resistência ao vanádio (AENDEKERK et al., 2002).

2.8.3.3. Enzimas inativadoras de aminoglicosídeos

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* produzem enzimas capazes de promover acetilação, fosforilação ou adenilação em moléculas de aminoglicosídeos, sendo um dos mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos (MINGEOT-LECLERQ et al., 1999; POOLE, 2005). A presença das enzimas 3-acetiltransferase e 2-adeniltransferase tornam o micro-organismo resistente à gentamicina e tobramicina, e as enzimas 3-fosfotransferase e 6-fosfotransferase agem em neomicina e kanamicina (MINGEOT-LECLERQ et al., 1999).

2.8.3.4. Alteração alvo de fluoroquinolonas

A classe de antibióticos fluoroquinolonas atua nas enzimas responsáveis pela separação da fita de DNA em duas fitas simples, as topoisomerases tipo II – DNA-girase nos micro-organismos Gram-negativos. O principal mecanismo de resistência às fluoroquinolonas são provenientes de mutações no gene codificante da DNA-girase, alterando sua estrutura, e consequentemente diminuindo a afinidade das fluoroquinolonas pela enzima. Essa modificação ocorre no gene *gyrA*, responsável por codificar a subunidade A da DNA-girase, alterando os aminoácidos na região terminal da proteína (HANCOCK, 1998; MANSILLA; GARROTE, 1998).

2.8.3.5. Produção de β -lactamases por *P. aeruginosa*

A classe de antibióticos β -lactâmicos possui ação na síntese da parede celular bacteriana, sendo caracterizados pela presença de um agrupamento químico heterocíclico azetidiona (denominado anel β -lactâmico), o qual interage com proteínas da parede, inibindo a transpeptidase, consequentemente impedindo a síntese do peptidoglicano e causando a lise celular (LIVERMORE, 1995; TORTORA et al., 2005). Penicilinas e cefalosporinas são antibióticos pertencentes ao grupo em questão (HANCOCK, 1998).

As enzimas β -lactamases são responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico do antimicrobiano, potencializando o efeito dos sistemas de efluxo e da baixa permeabilidade celular a favor da resistência microbiana (LI et al., 1995). Os genes que codificam β -lactamases podem ser cromossômicos ou plasmidiais (TENOVER et al., 1995).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) produzidas por *P. aeruginosa* pertencem às classes A, B e D de Ambler, e são responsáveis por hidrolisar cefalosporinas,

penicilinas e monobactâmicos. Apesar de serem encontradas principalmente em enterobactérias, o primeiro relato de uma delas por *P. aeruginosa* ocorreu em 1992, num paciente da Turquia hospitalizado na França, e foi denominada enzima PER-1 (NORDMANN et al., 1993). A partir desta, outras foram sendo isoladas na espécie, como a β -lactamase TEM-42, por Mugnier et al. (1996), e a SHV-2a foi isolada em Paris em 1995 e 1996 (NORDMANN; GUILBERT, 1998). PER-1, TEM-42 e SHV2a pertencem à classe A na classificação de Ambler (AMBLER et al., 1991).

Dentro da classe D de β -lactamases encontram-se as tipo OXA (oxacilinas), que dão resistência a cefalotina, ampicilina, oxacilina e cefalosporinas de terceira geração e aztreonam (NORDMANN; GUILBERT, 1998). Assim como as enzimas TEM e SHV, as OXA sofreram mutações pontuais em seus genes, possuindo um extenso número de derivados das variantes OXA-2 e OXA-10 (NORDMANN et al., 1993). Essas enzimas são encontradas principalmente em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (NORDMANN; GUILBERT, 1998).

Carbapenases são β -lactamases de classe B de Ambler, e agem destruindo cefalosporinas e carbapenems, mas não aztreonam (SANTOS-FILHO, 2002). São conhecidas por Metallo- β -Lactamases (MBL), e possuem íons zinco em seu sítio ativo (BUSH, 1998), sendo a IMP-1 a primeira a ser descrita em *P. aeruginosa* (WATANABE et al., 1991). Outras três carbapenases produzida pela bactéria foram descritas após a IMP-1, como VIM-1 (LAURETTI et al., 1999) e VMI-2 (POIREL et al., 2000) e SPM-1 (GALES et al., 2003).

2.8.3.6. Resistência de *P. aeruginosa* à polimixina

Polimixinas, representadas pela polimixina B e colistina, pertencem ao grupo dos peptídeos catiônicos com ação antimicrobiana e atuam ligando-se ao LPS por meio de interações com ácidos graxos e fosfatos da membrana externa, alterando sua permeabilidade através do deslocamento de cátions divalentes, e conseqüentemente provocando a morte celular (MOSKOWITS et al., 2004).

Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem proteases capazes de degradar a polimixina, impedindo a ação detergente da mesma sobre a superfície celular (MOSKOWITS et al., 2004). Outro mecanismo utilizado pela bactéria é diminuir a concentração de cátions divalentes, alterando o alvo do antimicrobiano em questão (GALES et al., 2001; MOSKOWITS et al., 2004).

2.8.4. *P. aeruginosa* e os antibióticos

As principais drogas utilizadas para tratamentos de infecções por *P. aeruginosa* são penicilinas com inibidor de β -lactamases (piperacilina combinado a tazobactam), cefalosporinas de terceira, quarta e quinta geração (ceftazidima, cefepime e ceftobiprole), carbapenêmicos (meropenem e imipenem), peptídeos catiônicos (polimixina B e colistina) e aminoglicosídeos (amizacina e gentamicina) (SILVA et al., 2010).

Sader et al., 2001 relataram o aumento de 31,2% da resistência de *P. aeruginosa* ao imipenem no período entre 1997 e 1999, e de 65,3% dentro do período de 1998 a 2004 (MOET et al., 2007). Estudos de Zavascki et al. (2006) encontraram índices de resistência do micro-organismo de 61,2% a piperacilina com tazobactam, 56,7% ao imipenem, 52,2% ao meropenem, 48,6% a ceftazidima. Sensibilidades de 80% da amostra aos carbapenêmicos, 62% a aminoglicosídeos, 60% as cefalosporinas de terceira geração, 56% a quinolonas foram demonstrados no estudo de Sader et al. (2001).

O aumento de relatos da multirresistência de *P. aeruginosa* mostra-se alarmante, e apesar do surgimento de novos antibióticos ainda há necessidade de estudos e desenvolvimento de novos e mais eficazes métodos de tratamento deste patógeno.

2.9. Terapias antifúngicas

A lista de drogas antifúngicas é extensa, embora estrita quando comparada às drogas antibacterianas disponíveis. Há dificuldade em encontrar um antimicrobiano que ataque células fúngicas sem ou com o mínimo de danos às células do hospedeiro (humano ou animal), sendo que a maioria atua na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), enquanto outras (fluocitosina e griseofulvina) atuam na síntese do ácido nucleico (LACAZ; NEGRO, 1991).

O tratamento de micoses em humanos nem sempre é efetivo, tendo em vista a comum recorrência de muitas doenças, evidenciando a limitada eficácia dos antifúngicos disponíveis (WOODFOLK, 2005). O aparecimento de cepas resistentes também faz-se preocupante (GUPTA; KOHLI, 2003). Para o tratamento de doenças causadas por dermatófitos ainda há preocupação em relação à toxicidade, e alto custo da terapia (HAINER, 2003). O mecanismo de resistência de fungos tem sido pouco avaliado em comparação ao de bactérias.

Desde os anos 50 o tratamento padrão de infecções graves causadas por fungos é feito com o uso de anfotericina B e triazólicos (fluconazol e itraconazol) (SABLE et al., 2008).

Devido às limitações de espectro de ação, surgimento de resistência e formulação, novos compostos triazólicos foram desenvolvidos, como voriconazol e posaconazol, com maior espectro de atividade (SIDRIM; ROCHA, 2004). A nova classe de antimicrobianos equinocandina, caspofungina e micafungina também surgiram, como alternativa para o tratamento de infecções fúngicas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para o tratamento de afecções causadas por fungos superficiais e leveduras são utilizados principalmente os antifúngicos nistatina, tiabendazol, clotrimazol, miconazol, hexidine, pimaricina e cetoconazol, e normalmente o uso tópico é suficiente (MACHADO et al., 2003; XAVIER; NASCENTE, 2003).

Com o advento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e expansão da terapia do câncer, a imunossupressão passou a ser um problema nestes pacientes, sendo que infecções passaram a ser mais frequentes, e o tratamento das mesmas mais complicado, sendo que a resistência microbiana em *Candida* foi emergida com o uso da terapia com fluconazol (REX et al., 1995), e os primeiros relatos de resistência aos poliênicos ocorreram por Larsh (1962).

A faixa de CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) para os diferentes antifúngicos varia conforme micro-organismo e droga. Cetoconazol a 10 ppm inibem o crescimento de *M. pachydermatis*, e a 50 ppm inibe *T. mentagrophytes*, sendo que *C. albicans* não foi tão suscetível ao antifúngico (GABAL, 1986). Coutinho (1997) obteve resultados de CIM de 0,02 ppm do antimicrobiano frente a *M. pachydermatis*, e o itraconazol demonstrou CIM média de 0,004 ppm contra *M. pachydermatis*. *Candida* spp possuem sensibilidade ao fluconazol, voriconazol (KAPPE, 1999), terbinafina, flucitocina (RICHARDSON; WARNOCK, 1993), nistatina (PRESCOTT; BAGGOT, 1991), pneumocandinas e echinocandinas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Griseofulvina é o principal antimicrobiano usado contra dermatófitos, não tendo efeito sobre outros fungos (LACAZ; NEGRO, 1991).

O aumento da resistência de fungos e bactérias aos antimicrobianos disponíveis no mercado é alarmante. A busca por novos compostos com ação antimicrobiana vem ocorrendo na comunidade científica, não somente produzidos por leveduras, mas presentes em plantas, poríferos e outros organismos (KOSSUGA et al., 2007; WANG et al., 2007; SALLEM et al., 2010).

Devido à necessidade de obtenção de novas moléculas que possam contribuir para o controle dos fungos e bactérias patogênicas, o presente trabalho visou investigar a capacidade antifúngica e antibacteriana do extrato produzido pelo fungo *T. asahii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato fermentado bruto e parcialmente purificado obtido da cultura de *T. asahii*, visando um possível aproveitamento biotecnológico.

3.2. Objetivos específicos

- Obtenção do extrato bruto de *T. asahii* pelo cultivo em fermentador de bancada;
- Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) a partir do extrato bruto para *C. albicans*, *X. campestris*, *M. pachydermatis*, *T. mentagrophytes* e *P. aeruginosa*;
- Fracionamento do extrato bruto e obtenção do extrato diclorometano e hexânico;
- Purificação do extrato diclorometano através de técnicas cromatográficas e precipitação com sulfato de amônio;
- Determinação da CBM para *P. aeruginosa* e *X. campestris* dos extratos obtidos das diferentes etapas de purificação;
- Análise dos parâmetros de fermentação do *T. asahii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos e cultivo

Como organismos teste do efeito inibitório do extrato fermentado do *T. asahii* foram utilizados os fungos *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, e as bactérias *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 27853. Todas as linhagens utilizadas estão depositadas junto à coleção do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LABI), da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP – Assis. Exceto *T. asahii* e *X. campestris*, que foram isolados no Laboratório de Biotecnologia Industrial da UNESP – Assis, todos micro-organismos foram fornecidos pela Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” – Campinas.

No presente trabalho foi utilizada uma linhagem de *Trichosporon asahii*, coletada na Mata Atlântica e identificada como MA15-1. O cultivo e o armazenamento da cultura foi realizado em meio específico para fungos CCT 2768 (extrato de levedura (0,5%); glicose (2,0%); fosfato de sódio monobásico (0,05%); sulfato de magnésio (0,05%); cloreto de potássio (0,05%); nitrato de sódio (0,2%); peptona (1,5%) e ágar bacteriológico (2%) para meio sólido; diluídos em água destilada (m/v); pH 5,5) (AZEVEDO, 2011).

O cultivo e armazenamento das duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 e ATCC 9027) foi feito em caldo Luria Bertani (LB), constituído por (m/v): triptona (1,0%), extrato de levedura (0,5%), cloreto de sódio, (1,0%) e ágar-ágar (1,0%), diluídos em água destilada, pH 7,2 (ATLAS, 1993).

A cepa *X. campestris* pv. *campestris* FCLA 26 do micro-organismo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tem como meio utilizado para isolamento, manutenção de crescimento do micro-organismo o meio formulado por Silva (2004), ou MFS (m/v): extrato de levedura (3,0%), sacarose (25,0%), sulfato de magnésio heptahidratado (0,1%), fosfato de potássio (2,5%), fosfato de amônio bibásico (1,5%) e ágar (2,0%) para meio sólido, em pH 6,0.

O meio utilizado para os micro-organismos *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* foi o YMA (denominado neste trabalho como meio formulado MF), composto por: extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), dextrose (1,0%) e ágar (2,5%), dissolvidos em água (m/v) e com pH 6,5 (NAKAJIMA et al., 1990).

Para a levedura *Malassezia pachydermatis* o meio utilizado é denominado MM (meio modificado do mDixon), e composto por: extrato de malte (1,8%), peptona (1,8%), tween 40

(0,5%), glicerol (0,25%) e ágar (2,5%), dissolvidos em água (m/v) e ajustados para pH 6,5 (ROSA et al., 2006).

Todos os meios de cultivo foram esterilizados em Autoclave (Fabbe-Primar, modelo 103), por 20 minutos à pressão de 1 atm e temperatura de 121°C antes de serem utilizados em qualquer procedimento.

Devido à patogenicidade dos micro-organismos utilizados, o que classifica o risco e as medidas de biossegurança como nível 2 (micro-organismos que podem provocar enfermidades humanas, em animais e no ambiente, mas que tem pouca probabilidade de contaminar os trabalhadores do laboratório, a comunidade, os animais ou o meio ambiente), foram tomadas as seguintes medidas de biossegurança: imunização contra difteria, febre tifóide, hepatite B, poliomielite, rubéola, sarampo, tétano e tuberculose; não pipetar com a boca; não comer, não fumar, não beber e nem guardar alimentos ou aplicar cosméticos; lavar as mãos frequentemente; descontaminação do local de trabalho ao final da jornada; descontaminação de amostras, culturas e materiais em autoclave; utilização de avental ou uniforme; uso de sapato fechado, luvas, óculos de proteção e máscara, sempre que necessário; acesso somente de pessoal qualificado; não permitir a entrada de crianças e de animais; eliminação de artrópodes e roedores.

4.2. Ativação e preservação dos micro-organismos utilizados

Tanto a preservação quanto ativação das culturas de *T. asahii*, *C. albicans*, *X. campestris*, *M. pachydermatis*, *T. mentagrophytes* e *P. aeruginosa* foram realizadas da mesma forma. A preservação foi feita através do armazenamento em tubos de *Eppendorf* com o micro-organismo crescido em seu meio específico (meio específico para fungos CCT 2768 para o *T. asahii*, LB para *P. aeruginosa*, MFS para *X. campestris*, MF para *C. albicans* e *T. mentagrophytes*, e MM para *M. pachydermatis*), com 10% de glicerol estéril (autoclavado por 20 minutos à pressão de 1 atm a 121°C, em autoclave (Fabbe-Primar), e posterior congelamento em tambor com nitrogênio líquido (Nitropec, modelo Volta20). As culturas também foram preservadas através de repicagem em meio sólido inclinado (incubadas por 24 h ou 72 h a 28°C em estufa de cultura – Fanem, modelo 002CB), com posterior adição de óleo mineral estéril por toda superfície, e armazenadas em refrigerador (Bosch modelo Ecoplus 430).

A ativação das culturas foi realizada utilizando alça de platina, em condições assépticas, do micro-organismo criopreservado para tubos de ensaio com 9 mL do meio

específico líquido, incubados por 72 h a 28°C em estufa de cultura (Fanem, modelo 002CB). Após o crescimento da cultura, foram feitas mais duas repicagens assepticamente, usando alça de platina para o mesmo meio de cultura a fim de se obter a ativação por completo do micro-organismo.

Para ativação quinzenal, as culturas de fungos foram repicadas em ágar inclinado e/ou meio líquido, incubados por 72 h em estufa de cultura (Fanem, modelo 002CB) a 28°C, e armazenadas em freezer (Bosch modelo Ecoplus 430), e as culturas bacterianas foram repicadas semanalmente em meio líquido específico, incubadas em estufa de cultura (Fanem, modelo 002CB) por 48 h a 28°C, e preservadas em refrigerador (Bosch modelo Ecoplus 430).

4.3. Produção do extrato fúngico de *T. asahii* em biorreator

Para a produção do extrato foi adicionado 5 mL de água destilada estéril a um tubo de ensaio com ágar inclinado com o fungo *T. asahii*. Para ocorrer o desprendimento dos conídios (esporos fúngicos), o tubo foi agitado. Deste tubo, o micro-organismo foi inoculado, assepticamente, em um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura específico para fungo CCT2768. O cultivo ocorreu em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, TE421), a 150 rpm a 28°C, por 48 horas. Para padronizar o inóculo foi utilizada a Câmara de Contagem (Neubauer), em 10^6 células/mL. Após este período, todo conteúdo desse Erlenmeyer foi transferidos para outro, que continha 400 mL do mesmo meio, e que foi mantido nas mesmas condições e mesma incubadora por 72 h.

Finalmente, este último Erlenmeyer teve seu conteúdo adicionado a 4 L do meio CCT2768 e posto em biorreator de bancada 7L (TECBIO - TECNAL, Piracicaba, SP) (Figura 9). A temperatura foi mantida em 28°C de acordo com o protocolo escolhido, com variação máxima e mínima de 0,5°C (sensor PT - 100). A concentração de oxigênio no vaso foi monitorada através de eletrodo (InPro6800/12/320 Mettler Toledo). Este teve seu calibramento no instante inicial, antes da inoculação do reator. O controle de oxigênio no meio de cultura foi feito através da aeração e agitação. O sistema de pressão no interior do vaso de reação é composto por sensor de pressão Piezo-Resistivo e linha de alívio de pressão comandada por válvula. A leitura de rotação foi feita por sensor ótico acoplado ao equipamento, e a agitação no interior do biorreator ocorreu através da pá e de acordo com o nível de oxigênio.



Figura 9 - Fermentador 7L TECBIO - TECNAL, Piracicaba, SP (Fonte: Thaís Shinya).

Decorrido o período de 72 h de incubação, o material foi centrifugado a 2.500 rpm por 20 minutos a 4°C (Centrífuga Cryofuge 6000i, Kendro Laboratory Products), e o sobrenadante utilizado como extrato fermentado bruto de interesse. O extrato bruto foi totalmente seco em estufa (37°C), e ressuspendido com água destilada estéril.

Este extrato bruto teve sua CBM e CFM determinada para todos micro-organismos do presente trabalho (*C. albicans*, *X. campestris*, *M. pachydermatis*, *T. mentagrophytes* e *P. aeruginosa*).

4.4. Métodos de pré-purificação do extrato líquido bruto

4.4.1. Através de solventes orgânicos

A metodologia para pré-purificação do extrato líquido bruto através de solventes orgânicos está representada na Figura 10, e foi descrita por Azevedo et al. (2011).

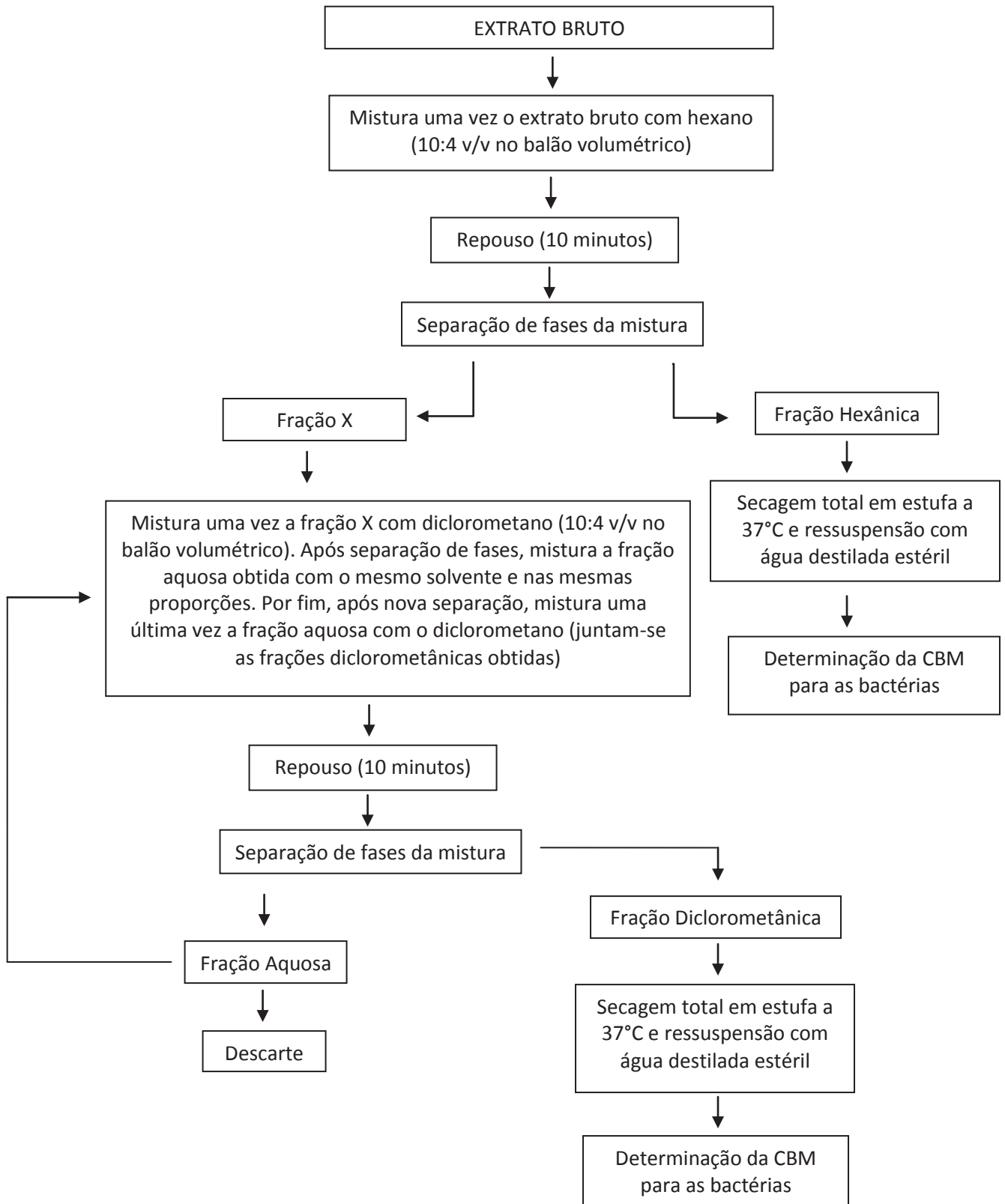


Figura 10 - Fluxograma da metodologia de pré-purificação do extrato líquido bruto através de solventes orgânicos.

Misturou-se, num funil de separação, 100 mL de extrato bruto com 40 mL de hexano. Após dez minutos de repouso, as frações foram separadas, originando a fração hexânica e a fração X.

A fração X sofreu outra extração, com o solvente diclorometano. No funil de separação, foram misturados a fração X e o solvente diclorometano, numa proporção de 10:4 (v/v). Após 10 minutos de repouso, com posterior separação de fases, formou-se duas novas frações: a diclorometânica e a aquosa. Com a fração aquosa foi repetida a mistura com o solvente diclorometano, nas mesmas proporções (10:4 v/v), e após nova separação de fases, a nova fração aquosa sofre uma última vez a mesma extração com o mesmo solvente (mesmas proporções). As frações diclorometânicas obtidas foram misturadas.

As frações diclorometânica e hexânica foram vertidas em taças de descanso, e o seu conteúdo totalmente seco em estufa (37°C). A ressuspensão dos sólidos das duas frações foi feita com adição de água destilada estéril. A fração aquosa não foi testada por não apresentar efeitos antimicrobianos contra *P. aeruginosa* em estudos realizados anteriormente (AZEVEDO, 2011).

As frações hexânica e diclorometânica tiveram seu efeito testado frente a *P. aeruginosa* e *X. campestris*, micro-organismos que tiveram a CBM do extrato bruto determinada.

4.4.2. Cromatografias de troca iônica e de coluna de sílica em gel

A fim de purificar mais o extrato antimicrobiano de *T. asahii*, obtido no item 4.4.1, o mesmo foi submetido a uma separação por cromatografia de troca iônica e por uma separação cromatográfica por coluna de sílica gel.

O procedimento de cromatografia de troca iônica utilizado foi descrito por Carvalho et al. (2010) com algumas modificações. Foi utilizada uma coluna aberta com capacidade de 25 mL, contendo 8 mL de resina catiônica CM Sepharose (CL-6B – SIGMA-ALDRICH®). A resina foi equilibrada com tampão acetato-acido acético pH 4, e o extrato diclorometânico teve seu pH ajustado para 4. Após empacotada, foram vertidos 6 mL do extrato diclorometânico, e recolhidas três frações de 2 mL cada. Por fim, 3 mL de NaCl (1,0 mol/L) foram passados na coluna a fim de retirar totalmente o extrato adsorvido na coluna, sendo esta última fração recolhida. As quatro frações (1^a, 2^a, 3^a, e 4^a frações) secaram em estufa e foram ressuspensas em água, e tiveram seu efeito testado frente às duas cepas de *P. aeruginosa* e *X. campestris*.

A cromatografia de coluna de sílica gel foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Toledo e Camargo (1998), com algumas modificações apresentadas a seguir. A fração diclorometânica foi passada através de uma coluna cromatográfica aberta de vidro, contendo 10 g de sílica gel (60G - Merck) eluída em 20 mL do solvente hexano. Após empacotamento da coluna, foram vertidos 4 mL do extrato diclorometano ao topo da coluna. Assim que o extrato foi adsorvido na sílica, foram passados 5 mL da solução de solventes acetona, metanol e éter de petróleo (1:1:1), sendo recolhida a primeira fração, de 5 mL (denominada neste trabalho de fração solvente). Por fim, foram passados 5 mL de água destilada, e esta fração recolhida (fração água). Ambas frações secaram em estufa e foram ressuspendidas em água destilada, e tiveram seu efeito testado contra as bactérias teste.

4.4.3. Precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto e o extrato diclorometânico foram submetidos à precipitação de 35%, 55%, 70% e 90% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O procedimento utilizado foi o descrito por Freitas (2012) com algumas modificações. O sal foi adicionado lentamente à 5 mL de cada extrato, com agitação branda em banho de gelo, permanecendo em repouso por 24 horas, sob refrigeração. Passadas 24 h, os extratos foram centrifugados a 4000 rpm, em 4°C por 20 minutos, sendo o precipitado solubilizado em tampão acetato de sódio 0,25 mol/L, pH 4, e dialisado contra o mesmo tampão. O sobrenadante e o precipitado foram posto em estufa para secagem (37°C), e ressuspendidos em água, tendo sua ação antimicrobiana testada frente à *P. aeruginosa* e *X. campestris*.

4.5. Teste de Concentração Fungicida e Bactericida Mínima

4.5.1. Padronização dos inóculos dos micro-organismos

A padronização dos inóculos de *C. albicans*, *X. campestris*, *M. pachydermatis*, *T. mentagrophytes* e *P. aeruginosa* foi realizada para garantir que parcelas iguais de micro-organismos fossem introduzidas nos diferentes tubos de ensaio. O meio líquido com o micro-organismo crescido por 48 h foi diluído com água estéril até que se atingisse uma absorbância entre 0,15 e 0,18, analisada através da densidade óptica a 600 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro (FEMTO 700 plus), de acordo com o padrão Mcfarland (JONES et al., 1985), que equivale a 10^7 - 10^8 células/mL.

4.5.2. Determinação das Concentrações Fungicidas e Bactericidas Mínimas

A determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) foi realizada através da técnica de macrodiluição seriada e plaqueamento *pour plate* segundo descrito por Souza et al. (2000), com algumas modificações apresentadas. Primeiro, para a realização da macrodiluição seriada, foram adicionados 4 mL do extrato de interesse (extrato bruto, fração hexânica, fração diclorometânica, frações das cromatografias ou da precipitação por sulfato de amônio) num primeiro tubo contendo 4 mL de meio de cultura específico para cada micro-organismo (LB para *P. aeruginosa*, MFS para *X. campestris*, MF para *C. albicans* e *T. mentagrophytes*, e MM para *M. pachydermatis*) com o quádruplo da concentração de sólidos. Após homogeneização deste primeiro tubo, 4 mL foram passados para um segundo tubo, que continha 4 mL do mesmo meio específico com o dobro da concentração de sólidos e, após homogeneização, o procedimento repetido para mais 3 tubos, todos com 4 mL com o dobro da concentração de sólidos, sendo os últimos 4 mL do quinto tubo descartados.

Nesses tubos foram inoculados 4 mL do micro-organismo desejado, padronizado conforme o item 4.5.1, e estes tubos incubados em estufa de cultura (Fanem, modelo 002CB) a 28°C por 24 horas. Como controle, um tubo contendo 4 mL de meio com o dobro da concentração de sólidos e 4 mL do inóculo padronizado foi utilizado.

Passado esse tempo, retirou-se, asépticamente, 1 mL de cada tubo, diluindo-o em um novo tubo com 9 mL de água peptonada (0,1% de peptona). Desse primeiro tubo, após homogeneização, retirou-se 1 mL, e passou-os para um segundo tubo com 9 mL de água peptonada (0,1 % de peptona), que também sofreu homogeneização, e o processo repetido até o quinto e último tubo, sendo descartado 1 mL final, e obtendo diluições de 10^{-1} até 10^{-5} .

Em seguida, a análise da CFM e CBM foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade *pour plate*, descrita por Speck (1976). A análise por absorbância não é possível por causa do turvamento do meio pelo extrato (DUTRA, 2009; GARGEL et al., 2009; AZEVEDO, 2011). Em cada placa estéril foi inoculado 1 mL do extrato diluído nas diluições de 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} (em água peptonada) com o meio de cultivo, sendo esta placa posta em estufa de cultura (Fanem, modelo 002CB) a 28°C por 24 horas. Decorrido o tempo, foi feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas e com materiais esterilizados. Foi considerada como a CBM e CFM a concentração mínima do extrato em base seca, na qual não foi observada UFC no plaqueamento.

4.6. Procedimentos analíticos da fermentação

Durante o processo de fermentação do *T. asahii* em fermentador de bancada 7L foram recolhidas, assepticamente, amostras nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h. As análises dessas amostras compreenderam a quantificação celular, taxa de brotamento e viabilidade celular, determinação de açúcares redutores, pH e acidez total. Para os três últimos, foi utilizado o sobrenadante da centrifugação (20 minutos, 2500 rpm) das amostras.

4.6.1. Testes de quantificação da biomassa celular

A contagem celular direta em microscópio através da Câmara de Contagem (Neubauer) foi realizada a fim de se quantificar a quantidade de células/mL de cada amostra. O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por Lee et al. (1981). A determinação da quantidade foi encontrada segundo a equação:

$$n^{\circ} \text{ células/mL} = \sum \text{ dos quadrantes} \times 5 \times 10^4 \times \text{FD}$$

Onde: \sum dos quadrados = somatória do número de células contadas nos cinco quadrantes; 5×10^4 = ajuste de volume na câmara; FD = fator de diluição da amostra.

Para determinar a biomassa também foi feita a secagem do precipitado (biomassa) da centrifugação de 45 mL das amostras (4, 8, 12, 24, 48 ou 72 h) a 105°C até peso constante (CHEN et al., 2012). O peso seco da biomassa foi quantificado em g/L de extrato, medida indireta de quantificação de massa celular.

Outro método utilizado a fim de quantificar a biomassa celular ao longo da fermentação foi o de absorvância total. Este teste trata-se de uma quantificação indireta de densidade celular. A amostra coletada foi diluída em água, e lida em espectrofotômetro até que fosse obtida uma leitura entre 0,200 a 0,500 em densidade óptica de 600 nm (Femto 700 plus). O cálculo da absorvância total foi obtido pela equação:

$$\text{Abs total} = \text{FD} \times \text{abs}$$

Onde: FD = Fator de diluição da amostra; abs = valor da absorvância obtida com a diluição (entre 0,200 a 0,500).

Os testes de quantificação celular, de viabilidade e brotamento foram realizados logo após a coleta das amostras.

4.6.2. Viabilidade celular e brotamento

A determinação da viabilidade celular foi realizada através da contagem de células vivas/mL do extrato (LEE et al., 1981). Foi adicionado 1 mL de cada amostra em 1 mL de solução corante de azul de metileno (azul de metileno 0,01 g e 2,0 g de citrato de sódio diluídos em 100mL de água). Após homogeneização, foi feita a contagem de células vivas (não coradas) em Câmara de Neubauer, e a determinação da viabilidade celular feita pela razão de células vivas/células totais (por mL de extrato). A equação utilizada para contagem de células vivas e totais está descrita no item 4.6.1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células (vivas + mortas)}} \times 100$$

Além da viabilidade celular, foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer de brotos vivos e mortos, a fim de se obter um parâmetro de reprodução ao longo da fermentação. Com a mesma amostra utilizada para determinação da viabilidade celular, foram contados os brotos vivos (não corados) e mortos (corados de azul) da suspensão (LEE et al., 1981). As equações utilizadas para determinação da taxa de brotamento, porcentagem de brotos vivos e mortos estão expressos a seguir. Para cálculo da taxa de brotamento, o número total de células foi referente ao total contado nos cinco quadrantes.

$$\text{Taxa de brotamento (\%)} = \frac{\text{total brotos vivos}}{\text{total de células}} \times 100$$

$$\text{Brotos vivos (\%)} = \frac{\text{total brotos vivos}}{\text{total de brotos}} \times 100$$

$$\text{Brotos mortos (\%)} = \frac{\text{total brotos mortos}}{\text{total de brotos}} \times 100$$

4.6.3. Quantificação de açúcares redutores

A análise de açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Foi utilizado o sobrenadante das amostras após centrifugação por 20 minutos a 2500 rpm. O teste foi realizado em triplicata.

A obtenção da curva padrão foi feita adicionando água a uma solução de glicose (1 mg/mL) (Tabela 1). No primeiro tubo foram postos 0,05 mL de solução glicose e 0,7 mL de água, totalizando 0,75 mL. Num segundo tubo, 0,1 mL de solução glicose com 0,65 de água, no terceiro 0,2 mL de solução e 0,55 mL de água, num quarto tubo 0,4 mL de glicose com 0,35 de água, e por fim, 0,5 mL de solução glicose com 0,25 mL de água no quinto tubo. Como tubo branco usou-se apenas 0,75 mL de água. Foi adicionado então 0,5 mL de DNS em cada tubo. Estes tubos foram postos em banho-maria (TECNAL- modelo TE-056) a 100°C por 5 minutos. Decorrido o tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo. Adicionou-se então 3,75 mL de água destilada, e todos os tubos foram lidos em comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro – Amershan Biosciences).

Tabela 1 - Curva de calibração para realização do Método DNS.

Tubos	Glicose (1 mg/mL)	Água (mL)	DNS (mL)
Branco	0	1,5	1
1	0,1	1,4	1
2	0,2	1,3	1
3	0,4	1,1	1
4	0,8	0,7	1
5	1,0	0,5	1

Para as amostras, houve uma diluição de 30 vezes para a realização do procedimento. 1,5 mL de cada amostra (4, 8, 12, 24, 48 ou 72 h) foram dosados em tubos, com posterior adição de 1,0 mL de DNS. A grade com os tubos foi posta em banho-maria fervente, durante 5 minutos. Depois, resfriou-se os tubos utilizando banho de gelo, com posterior adição de 7,5 mL de água destilada. A leitura dos tubos ocorreu em comprimento de onda 540 nm em espectrofotômetro.

Com a quantificação de açúcares redutores ao longo da fermentação e biomassa foi possível calcular o rendimento celular ($Y_{x/s}$), o qual foi realizado de acordo com a equação:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomassa final (g/L)} - \text{Biomassa inicial (g/L)}}{\text{AR inicial} - \text{AR final}}$$

4.6.4. Medição do pH

A determinação do pH foi feita pela medição das amostras (4, 8, 12, 24, 48 e 72 h) em pHmetro (Hanna pH 21 pH/mv meter).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do extrato bruto

Para se quantificar a quantidade do extrato bruto obtido do cultivo de *T. asahii*, o qual contém o agente antimicrobiano, fez-se necessário a determinação de sua massa seca, a partir da qual foi calculada a concentração em base seca do antimicrobiano presente em cada um dos tubos, e assim a determinação da CBM e CFM para cada micro-organismo.

A produção média do extrato bruto seco a partir do caldo fermentado foi de 25,4 g/L (Tabela 2). Pôde ser observado valores semelhantes entre as repetições, com um desvio padrão baixo (1,29).

Tabela 2 - Tabela de concentração de massa seca obtida a partir do extrato bruto de *T. asahii* incubado a 28°C em fermentador de 7L após 72 horas.

	Repetições (g/L)					Média	DP
	1	2	3	4	5		
Sólidos Presentes	27,1	25,9	24,1	24,0	26,7	25,4	1,29

5.2. Avaliação antimicrobiana do extrato bruto

Os ensaios de sensibilidade do extrato bruto foram realizados sobre todos os micro-organismos teste (*P. aeruginosa*, *X. campestris*, *C. albicans*, *M. pachydermatis* e *T. mentagrophytes*). Os resultados do teste com o extrato bruto estão expostos na Tabela 3. Para *Candida albicans*, a concentração de sólidos variou de 67750 µg/mL até 4234,4 µg/mL do

primeiro ao quinto tubo respectivamente. De acordo com os resultados, a CFM para este micro-organismo não foi encontrada ($>67750 \mu\text{g/mL}$).

Os outros fungos (*Trichophyton mentagrophytes* e *Malassezia pachydermatis*) foram avaliados com as concentrações de sólidos variando de $64750 \mu\text{g/mL}$ a $4046,87 \mu\text{g/mL}$ (último tubo). Os micro-organismos não se mostraram susceptíveis à quantidade de extrato bruto testado (CFM $> 64750 \mu\text{g/mL}$).

Para a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris*, a concentração de sólidos do primeiro ao quinto tubo abrangeu o intervalo de $75125 \mu\text{g/mL}$ à $4695,31 \mu\text{g/mL}$. Os resultados de plaqueamento demonstraram que a CBM foi de $75125 \mu\text{g/mL}$.

O teste de CBM da cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foi feito com o extrato bruto variando de $60000 \mu\text{g/mL}$ à $3750 \mu\text{g/mL}$. Com a outra linhagem, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a concentração de sólidos no extrato variou de $66750 \mu\text{g/mL}$ à $4171,87 \mu\text{g/mL}$. Ambas cepas foram susceptíveis ao antimicrobiano fúngico, resultando numa CBM de $30000 \mu\text{g/mL}$ sobre a cepa ATCC 9027 e de $33375 \mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem ATCC 27853.

Tabela 3 - Teste de macrodiluição em tubos a partir do extrato bruto seco obtido do cultivo de *T. asahii* frente aos micro-organismos teste, incubados a 28°C por 24 h.

Micro-organismo	CBM /CFM ($\mu\text{g/mL}$)*
<i>C. albicans</i>	>67750
<i>T. mentagrophytes</i>	>64750
<i>M. pachydermatis</i>	>64750
<i>X. campestris</i>	75125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	30000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	33375

* Os testes foram realizados em triplicata com extrato seco.

Segundo os resultados, o composto bioativo produzido por *T. asahii* demonstrou ser mais eficiente contra as bactérias. O motivo para a insensibilidade das leveduras frente ao antimicrobiano pode ser devido a características morfológicas, como a formação de estrutura de parede celular (GOLUBEV, 2006).

Não foi encontrado na literatura nenhum registro de produção de antibióticos produzidos por *T. asahii*, apenas moléculas com atividade antimicrobiana (DUTRA, 2009;

GARGEL et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011), caracterizados por micocinas (DUBASH et al., 2010). As toxinas *killer* se assemelham às bacteriocinas produzidas por bactérias, sendo mais específicas que os antibióticos (FUENTEFRIA, 2004). De modo geral são efetivas contra células sensíveis da mesma espécie da levedura produtora, ou contra outros gêneros de leveduras, e em alguns casos outros micro-organismos (GOLUBEV, 2006). Outra característica das micocinas é sua baixa massa molecular (GOLUBEV, 2006).

A produção de toxinas *killer* por fungos do gênero *Trichosporon* é relatada na literatura. *T. pullulans* demonstrou produzir micocinas com peso molecular de 15 kDa (GOLUBEV et al., 2002), *T. porosum* teve detectada a produção de um glicolípido relacionado à atividade antimicrobiana do organismo (KULAKOWSKAYA et al., 2010). *T. japonicum* (SENER et al., 2011), *T. insectorum*, *T. faecale* e *T. coremiiforme* (FUENTEFRIA, 2007) e *T. figueirae* (MENEZHIN et al., 2010) também foram descritos como possuidores de atividade *killer*. Dubash et al. (2010) também demonstraram a presença das toxinas secretadas por *T. asahii*. A levedura em questão foi capaz de inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans*. De acordo com estas pesquisas, o fungo *T. asahii* provavelmente é um fungo que produz glicolípidos ou glicoproteínas com efeito *killer*.

Apesar da maioria dos estudos *killer* serem realizados contra leveduras, já há trabalhos que relatam a susceptibilidade de bactérias frente ao composto, como em *Staphylococcus aureus* (IZGU; ALTINBAY, 1997) para a micocina produzida por *Candida tropicalis*, e *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus subtilis* para *T. figueirae* (MENEZHIN et al., 2010). *Pichia kudriavzevii* produziu uma toxina que apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. alcaligenes* (BAJAJ et al., 2012).

Sener et al. (2011) encontraram as melhores condições de cultivo para *T. japonicum* e *Candida catenulata*, onde a maior atividade *killer* foi observada em menor tempo de incubação no pH 4,5 – 5,0, com 24 horas de incubação a 25°C e 150 rpm, contra *Cryptococcus gattii*. As condições pouco diferem daquelas testadas neste estudo (pH 5,5, incubação de 72 hs à 28°C e 150 rpm). Fuentefria (2007) também obteve uma micocina produzida por *T. insectorum* nas condições de pH 4 - 5,4 e entre 26°C a 40°C. De acordo com Golubev (2006), o aumento da temperatura de cultivo inativa a produção das micocinas.

Buzzini et al. (2007) indicam que o pH é o fator mais importante para produção de compostos antimicrobianos por leveduras, sendo o pH ácido o mais favorável, com um valor ótimo em 4,5. A temperatura ideal para produção dessas toxinas está na faixa de 22°C a 28°C

(SCHMITT; BREINIG, 2002). Em comparação a este estudo, a faixa de temperatura encontra-se dentro da sugerida por Buzzini et al. (2007), assim como o pH mais ácido.

Se o composto deste estudo tratar-se de uma micocina, o meio utilizado seria favorável para a produção da mesma, segundo Golubev (2006), que relata que a produção de micocinas é estimulada por meios ricos em glicose, peptona e extrato de levedura. O autor também afirma que a agitação do meio pode degradar toxinas com efeito *killer*, embora neste estudo a agitação não tenha sido observada a degradação completa do composto antimicrobiano. Senter et al. (2011) utilizaram um meio com agitação orbital para produção de uma micocina por *T. japonicum*, o qual da mesma forma produziu a toxina.

A concentração de células sensíveis também interfere na atividade micocinogênica (GOLUBEV, 2006). O autor propõe diminuir a concentração de células para 10^3 cel/mL, e não de 10^6 cel/mL como usualmente é feito para determinação da atividade antimicrobiana. Senter et al. (2011) confirmam essa teoria, o qual a concentração de 10^6 cel/mL de *Cryptococcus gattii* não apresentou halo de inibição para o extrato de *T. japonicum*, mas foi inibida na concentração de 10^3 cel/mL. O princípio ativo de *T. asahii* pode ser potencializado se testado frente à 10^3 cel/mL dos micro-organismos teste, e a atividade antimicrobiana talvez possa ser detectada frente aos fungos aqui testados que não tiveram uma CFM encontrada.

Apesar do relato de Dubash et al. (2010) sobre a produção de uma micocina por *T. asahii*, é necessária a identificação do composto antimicrobiano produzido pelo fungo para ser confirmado a natureza química da substância.

5.3. Determinação da CBM dos extratos pré-purificados

O extrato bruto de *T. asahii* fracionado com solventes foi testado sobre as duas cepas de *P. aeruginosa* e *X. campestris*, únicos micro-organismos que tiveram a CBM do extrato bruto determinada. As três cepas não demonstraram sensibilidade ao extrato hexânico (CBMs de >30000 $\mu\text{g/mL}$ para as *P. aeruginosa*, e >60000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *X. campestris*). Já para o extrato diclorometânico, a CBM foi determinada, sendo de 17.500 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, 20000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e de 60000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *X. campestris* (Tabela 4). Os resultados evidenciaram ainda que houve uma purificação do extrato bruto com o emprego dos solventes, através da remoção de partículas indesejáveis no extrato hexânico e, conseqüentemente, uma menor CBM do extrato diclorometânico em comparação ao extrato bruto.

Tabela 4 - Teste de CBM a partir do extrato bruto de *T. asahii* fracionado com os solventes hexano e diclorometano, após secagem.

Fração	CBM ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>X. campestris</i>
Hexânica	>30000	>30000	>60000
Diclorometânica	17500	20000	60000

A realização das outras etapas de purificação (cromatografias e precipitação com sulfato de amônio) foi feita a partir do extrato diclorometânico, fração a qual está presente o antimicrobiano de interesse do estudo. Os testes de CBMs destes purificados estão presentes na Tabela 5.

Para a cromatografia de troca-iônica houve uma purificação do extrato diclorometânico tendo em vista a diminuição da CBM para todas as bactérias testadas. O composto antimicrobiano de interesse não adsorveu na resina catiônica, demonstrando natureza aniônica, sendo a primeira fração coletada a que apresentou uma menor CBM (12000 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* ATCC 9027, 15000 $\mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 55000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *X. campestris*). As outras duas frações coletadas tiveram uma CBM acima da CBM da primeira fração (>14000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, >17000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853, e >57000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *X. campestris*). A última fração recolhida da cromatografia de troca-iônica coletada após passagem de NaCl (1,0 mol/L) teve uma CBM muito acima da primeira fração, sendo >30000 $\mu\text{g/mL}$ sobre as linhagens de *P. aeruginosa*, e > 60000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *X. campestris*.

A fração solvente e a fração água, da cromatografia com sílica gel, foram recolhidas e testadas frente à *P. aeruginosa* e *X. campestris*, embora não tenha sido possível uma separação cromatográfica do composto antimicrobiano. As CBMs de ambas frações não foram encontradas, sendo >17500 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, >20000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 e >55000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *X. campestris*.

Os testes com a fração diclorometânica precipitada com sulfato de amônio (35%, 55%, 70% e 90%) também não potencializaram o efeito inibitório do extrato. As CBMs dos sobrenadantes e dos precipitados foram acima de 17500 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, >20000 $\mu\text{g/mL}$ sobre a outra cepa de *P. aeruginosa*, e >55000 $\mu\text{g/mL}$ contra *X. campestris*.

Tabela 5 - Teste de macrodiluição em tubos a partir do extrato diclorometânico obtido do extrato bruto de *T. asahii*, pré-purificado através de cromatografia de troca-iônica, sílica gel e precipitação com sulfato e amônio.

Método	Fração	CBM (µg/mL)		
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>X. campestris</i>
Cromatografia troca-iônica	1ª fração	12000	15000	55000
	2ª fração	>14000	>17000	>55000
	3ª fração	>14000	>17000	>55000
	4ª fração	>30000	>30000	>60000
Sílica gel	Fração solvente	>17500	>20000	>55000
	Fração água	>17500	>20000	>55000
Precipitação sulfato de amônio (35%, 55% , 70% e 90%)	Sobrenadantes	>17500	>20000	>55000
	Precipitados	>17500	>20000	>55000

Estudos de Dutra (2009) confirmam a existência de um princípio ativo antimicrobiano produzido por *T. asahii* contra *P. aeruginosa*. A autora empregou protocolo onde o extrato bruto foi obtido em incubadora com agitação orbital, e purificado com clorofórmio e ressuspensão em Tween 80®, e obteve CBM de 7464 µg/mL para a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027, e de 14928 µg/mL para a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados, apesar de menores, mostraram-se semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, a qual teve um protocolo diferente utilizado.

Outro trabalho utilizando o caldo fermentado em agitador orbital do fungo *T. asahii*, purificado com clorofórmio e ressuspendido em Tween 80® obteve uma CBM de 16.240 µg/mL para a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 27853, e de 8120 µg/mL para a outra linhagem (*P. aeruginosa* ATCC 9027) (GARGEL, 2009), confirmando a ação antibacteriana encontrada nesta pesquisa com a fração diclorometânica.

A CBM do extrato fermentado de *Trichosporon asahii*, produzido em incubadora orbital e concentrado sem secagem total do mesmo, técnica diferente da usada no presente trabalho, foi feita por Azevedo et al. (2011). Os resultados obtidos pela autora foram bem melhores que aqueles obtidos neste trabalho (10,2 vezes inferior), sendo que para o extrato diclorometânico a CBM foi de 2050 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC 27853. A CBM do extrato hexânico também não foi determinada no estudo (>4843 µg/mL). A autora testou ambos os extratos contra *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae*, e encontraram uma CBM e CFM de 868 µg/mL e 217 µg/mL, respectivamente, para o extrato diclorometânico, e de 2421 µg/mL do extrato hexânico frente a *S. cerevisiae*. O estudo confirma que apesar do extrato hexânico inibir totalmente o crescimento de um dos micro-

organismos testados, a extração com o solvente diclorometano é mais eficiente tendo em vista uma menor CBM em relação ao hexano e, conseqüentemente, uma maior concentração do agente inibidor.

O método de extração com solventes ajuda na extração de substâncias bioativas (ANDREO; JORGE, 2006). A extração com o solvente hexano visa solubilizar óleos e ácidos graxos apolares, enquanto o diclorometano extrai compostos lipofílicos mais polares (FERNÁNDEZ et al., 1996). Uma maior purificação foi obtida com a extração líquido-líquido com o diclorometano, que removeu as demais substâncias lipofílicas polares (WALLIS; WEARNE, 1999).

Neste trabalho, o princípio ativo alvo encontrou-se na fração diclorometânica. Houve separação de lipídios apolares indesejáveis com a extração com o solvente hexano, purificando o extrato bruto de interesse (SILVA, 2007), tendo em vista que aumentou a CBM para a fração hexânica e diminuiu a CBM para a diclorometânica. Portanto o composto bioativo deste trabalho provavelmente se trata de uma substância lipofílica mais polar.

O resultado da cromatografia de sílica gel demonstra ainda que a separação do extrato diclorometânico pela polaridade não foi eficiente, diferentemente da separação iônica do extrato. De acordo com a extração líquido-líquido, se o composto bioativo tiver natureza polar, ele adsorveria na fase estacionária da cromatografia em sílica gel, portanto não saindo com o solvente orgânico, mas sairia na fração aquosa que teria sua CBM determinada. Contudo, essa separação cromatográfica não se mostrou eficiente na purificação do extrato diclorometânico da fermentação do *T. asahii*.

A precipitação por sais, ou *salting out*, ocorre pela desidratação da proteína por razão do sal adicionado, atraindo as moléculas do meio, de modo a ficar menos água disponível para as regiões hidrofóbicas das proteínas, que ficam expostas, podendo interagir e agregar entre si (SCOPES, 1994).

A precipitação com sulfato de amônio precipita proteínas, sendo que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína (PESSOA JR & KILIKIAN, 2005). A composição do extrato também pode influenciar a precipitação, assim como sua concentração e temperatura (SCOPES, 1994).

Nas concentrações testadas com sulfato de amônio (35-90%) não foi possível uma pré-purificação nem do extrato bruto (CBMs >30000 µg/mL sobre as *P. aeruginosa* e >70000 µg/mL sobre *X. campestris*, muito acima das encontradas através da purificação com solventes) nem do extrato diclorometânico, tendo em vista que as CBMs foram superiores a 17500 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, >20000 µg/mL sobre *P. aeruginosa* ATCC

27853 e >55000 µg/mL sobre *X. campestris*. Um motivo pela dificuldade na precipitação pode ser a degradação ou perda da atividade da micocina, causada pelas condições agressivas da precipitação, ou mesmo a natureza não proteica da micocina.

Senter et al. (2011) relataram também a não precipitação de uma micocina produzida por *T. japonicum*. Os autores testaram as concentrações de 20%, 40%, 65% e 80% de sulfato de amônio, e em nenhum dos testes realizados, frente à *Cryptococcus gattii*, obtiveram o halo de inibição do extrato de *T. japonicum* precipitado com o sal.

Se o composto bioativo de *T. asahii* se tratar de uma micocina, ela pode ter natureza glicolipídica, não sendo precipitada com sulfato de amônio. Como já foi descrito para esta mesma linhagem a inibição do crescimento contra outra levedura (*S. cerevisiae*) (AZEVEDO et al., 2011), é possível que este extrato contenha uma micocina com atividade antimicótica e antibacteriana.

Há relatos de micocinas de natureza glicolipídicas por *Trichosporon porosum* (KULAKOWSKAYA et al., 2010). A extração com solventes também corrobora a natureza lipofílica do antimicrobiano, por causa da afinidade do composto antimicrobiano com o diclorometano.

De acordo com os resultados, o melhor método para purificar o extrato diclorometânico foi através da cromatografia de troca-iônica, tendo em vista a diminuição de sua CBM contra os micro-organismos teste. De acordo com os resultados colhidos, o princípio ativo parece ser de natureza aniônica e lipofílica.

Apesar do extrato bruto seco do *T. asahii* ter apresentado uma elevada CBM, a purificação do extrato potencializou seu efeito antimicrobiano. A importância de descobrir novos compostos com efeito antagônico também deve ser levada em conta, tendo em vista a crescente resistência microbiana aos antibióticos utilizados na atualidade. Há necessidade da caracterização química da molécula antimicrobiana produzida pelo *T. asahii* a fim de determinar exatamente a sua natureza, e se o composto se trata ou não de uma micocina.

A Tabela 6 apresenta os valores de rendimento da extração com solvente e da primeira fração coletada da cromatografia de troca-iônica, etapas essas que apresentaram uma purificação do extrato bruto original de acordo com os valores de CBM encontrados.

Pode-se observar um rendimento de sólidos maior para a fração diclorometânica em relação à fração hexânica, demonstrando uma maior quantidade de sólidos extraídos pelo solvente diclorometano (de 9,6% a 13,1% de rendimento da fração hexânica, e de 19,3% a 25,8% de rendimento da fração diclorometânica). A primeira fração coletada da cromatografia de troca-iônica demonstrou um rendimento de 4,5% a 8,1% em relação ao extrato bruto. Para

cada 300 mL de extrato bruto obteve-se em média 8,80 g de sólidos. A média de teor de sólidos para a fração hexânica foi de 0,95 g, para a fração diclorometânica 1,86 g e para a primeira fração da cromatografia de troca-iônica foi de 0,14 g.

Tabela 6 - Cálculo de rendimento de sólidos presentes nos extratos após separação líquido-líquido e cromatografia de troca-iônica, em relação ao extrato bruto.

Extrato		Rendimento (m/m %)* ¹			Média de teor de sólidos (g)
Método	Fração	Repetições* ²			
		1	2	3	
-----	Bruto	100	100	100	8,80
Separação c/ solventes* ³	Hexano	13,1	9,9	9,6	0,95
	Diclorometano	25,8	19,3	19,3	1,86
Troca-iônica* ⁴	1ª fração	8,1	6,9	4,5	0,14

*¹ Cálculo em base seca de 300 mL do extrato utilizado. *² Repetições de três produções de extrato bruto de *T. asahii*. *³ Para o fracionamento com solventes foi utilizado 300 ml de extrato bruto. *⁴ Para a cromatografia de troca iônica foi utilizada 22.1% da fração diclorometano do total de 2,17 g, 1,95 g e 1,53g, para as respectivas repetições.

5.4. Parâmetros de fermentação do *T. asahii*

5.4.1. Quantificação do número de células ao longo da fermentação

Foram realizados três testes de quantificação celular ao longo do cultivo do *T. asahii* em fermentador de bancada. Os resultados das quantificações estão expostos na Tabela 7. A Figura 11 expõe ainda o gráfico do comportamento celular ao longo da fermentação de acordo com os três testes de quantificação realizados. Em todos pode ser observado um padrão semelhante, com aumento da densidade celular ao longo da fermentação, uma fase logarítmica nas primeiras 24 h, e um crescimento mais atenuado das 24 h até 72 h (fase estacionária). A quantificação celular através da biomassa seca pode ter tido interferências de compostos presentes no meio, tais como sais precipitáveis, nas primeiras 24 h de fermentação, que acabaram sendo contabilizados erroneamente como biomassa celular, e que depois foram consumidas pela levedura. De modo geral, o cultivo do *T. asahii* apresentou um bom crescimento celular e rendimento de biomassa.

Tabela 7 - Quantificação de células de *T. asahii* ao longo do cultivo de 72 h em fermentador de bancada 7L, utilizando três métodos de quantificação.

Tempo (h)	Contagem direta (célis/mL)	Biomassa (g/L)	Absorbância total (600 nm)
4	$5,6 \times 10^6$	1,16	0,87
8	$8,8 \times 10^6$	1,39	1,74
12	$1,2 \times 10^7$	1,62	2,34
24	$1,7 \times 10^7$	1,84	5,28
48	$3,7 \times 10^7$	2,55	7,04
72	$4,6 \times 10^7$	2,63	8,10

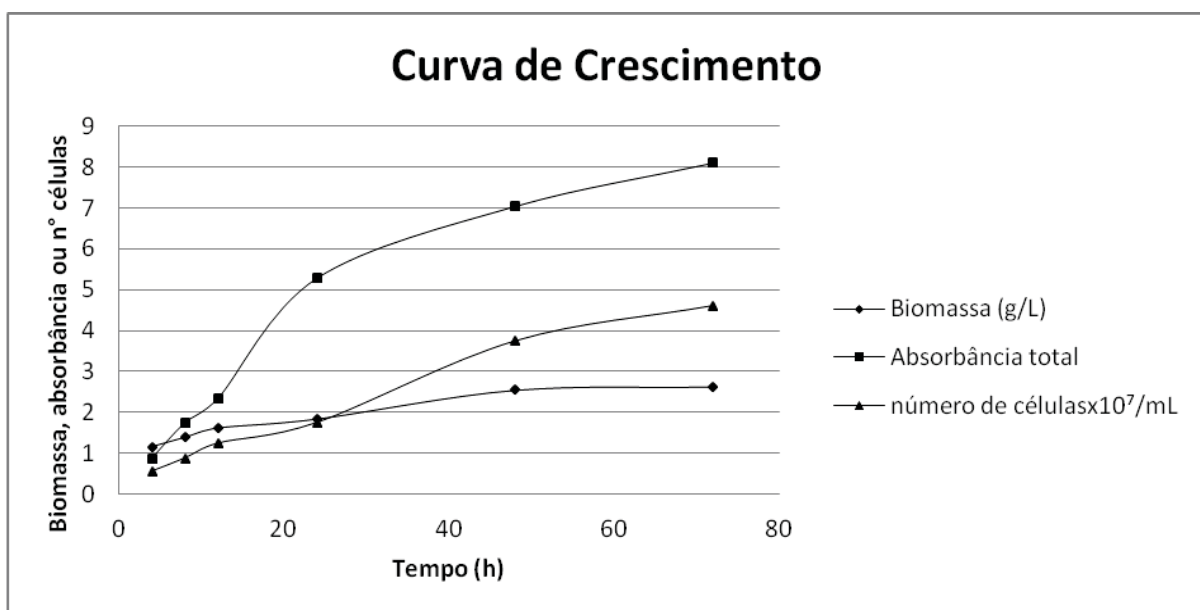


Figura 11 - Curva de crescimento do *T. asahii* ao longo do cultivo em fermentador de bancada 7L a 28°C através de três testes de quantificação celular.

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) foi feita a equação das retas obtidas dos Ln da absorbância, biomassa ou número total de células, das primeiras 24 h (fase log). As equações das retas estão descritas abaixo:

$$\text{Absorbância total: } y = 0,08 X - 0,2782 \quad R^2 = 0,95$$

$$\text{Nº total de células: } y = 0,05 X - 0,6177 \quad R^2 = 0,88$$

A velocidade específica de crescimento (μ) corresponde a fase log que se caracterizou nas primeiras 24 h de fermentação, variou de $0,05 \text{ h}^{-1}$ a $0,08 \text{ h}^{-1}$, sendo o primeiro valor correspondente à técnica de contagem de células totais/mL, e o segundo valor para

absorbância total. A biomassa seca não foi utilizada como técnica para medida de μ tendo em vista a provável interferência de sais e outros compostos, que podem ter sido contabilizados como biomassa, presente nas primeiras 24 h do cultivo do *T. asahii*.

Senter et al. (2011) calcularam a velocidade específica de crescimento de *T. japonicum* em cultivo em agitador orbital, para produção de micocina. Os autores testaram os pHs 4, 4,5, 5 e 5,5 e obtiveram os μ de, respectivamente, $0,87 \text{ h}^{-1}$, $0,66 \text{ h}^{-1}$, $0,63 \text{ h}^{-1}$ e $0,36 \text{ h}^{-1}$. Para a faixa de pH testada (pH 5,5) nesta pesquisa, o parâmetro μ demonstrou ser cerca de 4,5 vezes menor do que aquele encontrado para *T. japonicum*. Esta diferença pode ser associada tanto a diferença de linhagem, como do meio de cultivo e temperatura (no caso 25°C . para *T. japonicum* e 28°C . para *T. asahii*). Outra diferença foi o equipamento de cultivo, no presente trabalho foi realizado por fermentador de bancada 7L, enquanto no trabalho com *T. japonicum* foi usado incubadora orbital.

O pico da produção de micocinas de *T. japonicum* coincidiu com o final da fase log para os pHs 4 e 5 em estudos de Senter et al. (2011). Os autores observaram uma queda da ação antimicrobiana nesses pHs na fase estacionária de crescimento da levedura, com diminuição do halo de inibição contra *C. gattii*. Para o pH 5,5 entretanto, não houve esse decréscimo da atividade da toxina.

Neste estudo, o teste de CBM e CFM foi realizado com o extrato obtido da fermentação de 72 h, fase estacionária das células de *T. asahii*, em pH 5,5. Testes de CBM e CFM do extrato fermentado do *T. asahii* com menores tempos de fermentação precisam ser investigados, como amostras da fase logarítmica, como propõe Senter et al. (2011).

5.4.2. Determinação da viabilidade celular e taxa de brotamento

A viabilidade celular ao longo da fermentação está representada pela Figura 12. Observa-se inicialmente uma viabilidade bem elevada (98%) com uma diminuição ao longo do tempo de fermentação, chegando a 72% no final do processo, demonstrando que as condições de processo foram favoráveis à levedura. Tal queda é esperada e deve-se à diminuição de nutrientes no meio, acarretando numa diminuição da taxa de reprodução, e consequente queda na viabilidade celular.

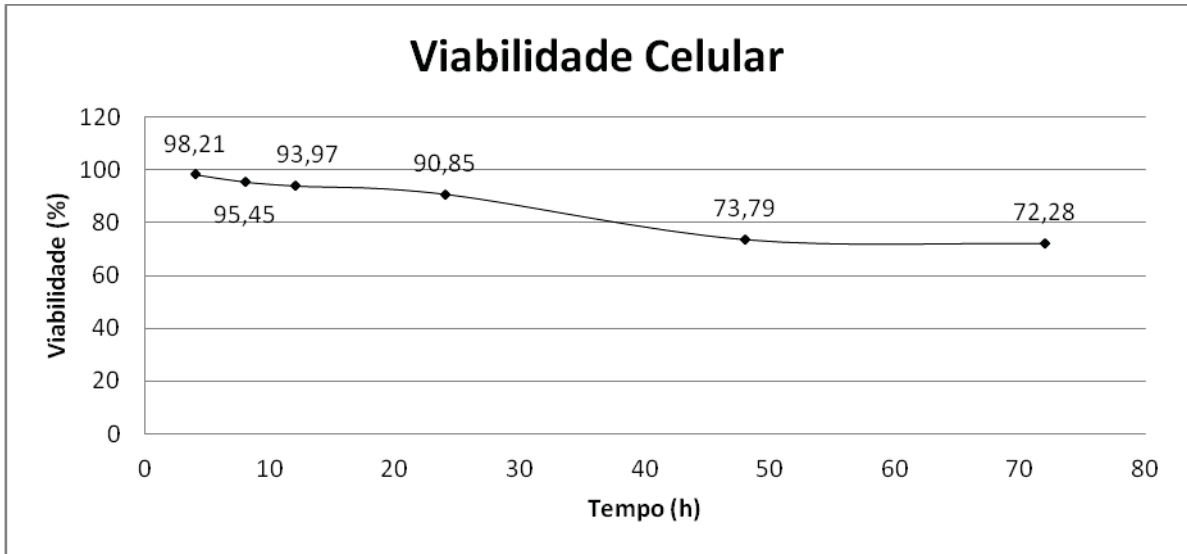


Figura 12 - Viabilidade celular do *T. asahii* ao longo da fermentação em fermentador de bancada 7L durante 72 h a 28°C.

A taxa de brotamento das células de *T. asahii*, bem como a quantidade de brotos vivos e mortos estão expressos na Tabela 8. Pode-se observar um elevado grau de brotamento (com praticamente todas as células brotando) até 12 h de fermentação. A partir de então houve um decréscimo na taxa de reprodução do fungo. A quantidade de brotos vivos começou em 95,2% na amostra das 4 h de fermentação, e diminuiu ao longo do tempo de cultivo. Já a quantidade de brotos mortos aumentou a cada amostra colhida, terminando com um total de 36,4% de brotos mortos em relação ao total de brotos.

Tabela 8 - Taxa de brotamento do *T. asahii* em cultivo em fermentador de bancada 7L a 28°C por 72 h.

Parâmetro de reprodução	Tempo de cultivo (h)					
	4	8	12	24	48	72
Taxa de brotamento	105%	106%	109%	92,5%	61,49%	53,9%
Brotos vivos	95,2%	94,9%	93,8%	87%	70,5%	63,6%
Brotos mortos	4,8%	5,1%	6,2%	13%	29,5%	36,4%

5.4.3. Quantificação dos açúcares redutores (AR) ao longo da fermentação

Para quantificação da quantidade de açúcares redutores em cada amostra coletada (4, 8, 12, 24, 48 e 72 h) foi feito o método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A curva padrão para quantificação de açúcares apresentou um R^2 de 99% (Anexo A).

Depois de obtida a curva de calibração, as amostras foram preparadas, sendo os resultados expostos na Figura 13, e a quantificação de AR em cada amostra pode ser observada na Tabela 9.

A concentração de açúcares redutores diminuiu de forma consistente até o final da fase log (24 h de fermentação), com um aumento acentuado da biomassa até então. Após este período, a concentração de açúcares redutores manteve-se estável, embora a concentração celular continuar crescendo, porém de forma mais atenuada (fase estacionária). Depois de obtida a curva de calibração, as amostras foram preparadas, sendo os resultados expostos na Tabela 9, com respectivas médias das leituras e desvio padrão (DP). A quantificação de AR em cada amostra pode ser observada na Figura 13.

Tabela 9 - Concentração de Açúcares Redutores ao longo da fermentação do *T. asahii* em fermentador de bancada 7L.

	Tempo (h)					
	4	8	12	24	48	72
Concentração de AR (g/L)	29,8	26,9	25,4	19,8	20,6	21,2

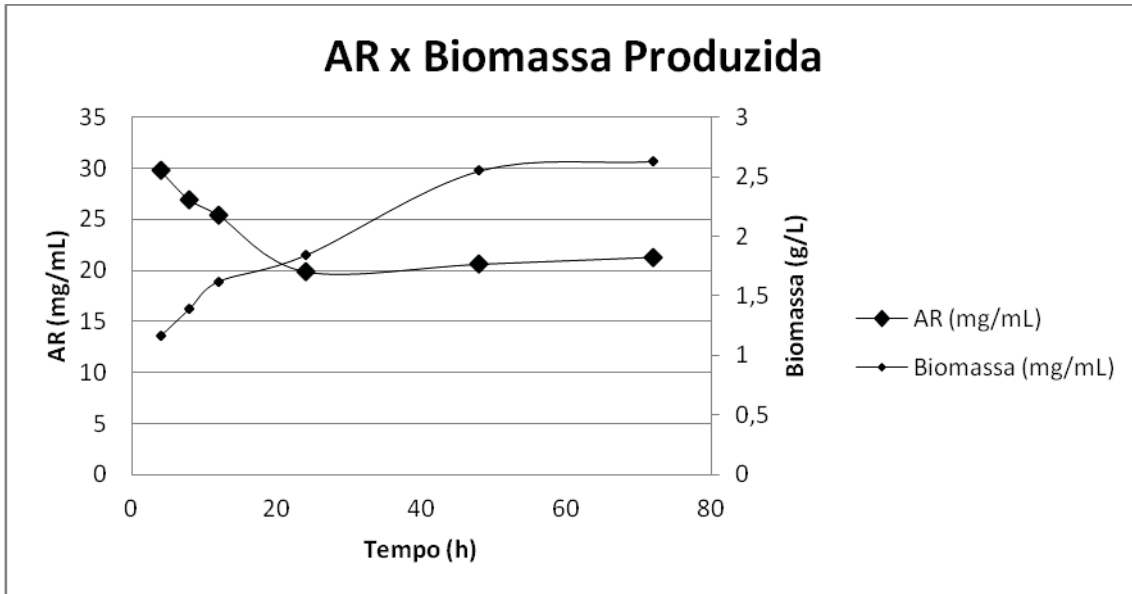


Figura 13 - Quantificação de Açúcares Redutores e Biomassa produzida ao longo da fermentação do *T. asahii* em fermentador de bancada 7L.

Através da quantificação da biomassa e de açúcares redutores ao longo da fermentação foi determinado o rendimento celular ($Y_{x/s}$) após 72 h de fermentação, o qual foi de 0,29 g biomassa/g de AR consumido.

5.4.4. Variação do pH

A medição do pH está exposta na Figura 14. O pH variou de 5,6 (início da fermentação) a 6,8 (pico do pH nas 24 h de fermentação). Observa-se um aumento do pH nas primeiras 4 horas de fermentação. O pH se mantém então relativamente estável até as 24 horas, e a partir de então decresce, ao final (72 horas de fermentação) atinge um pH de 5,7, semelhante ao das primeiras 4 horas.

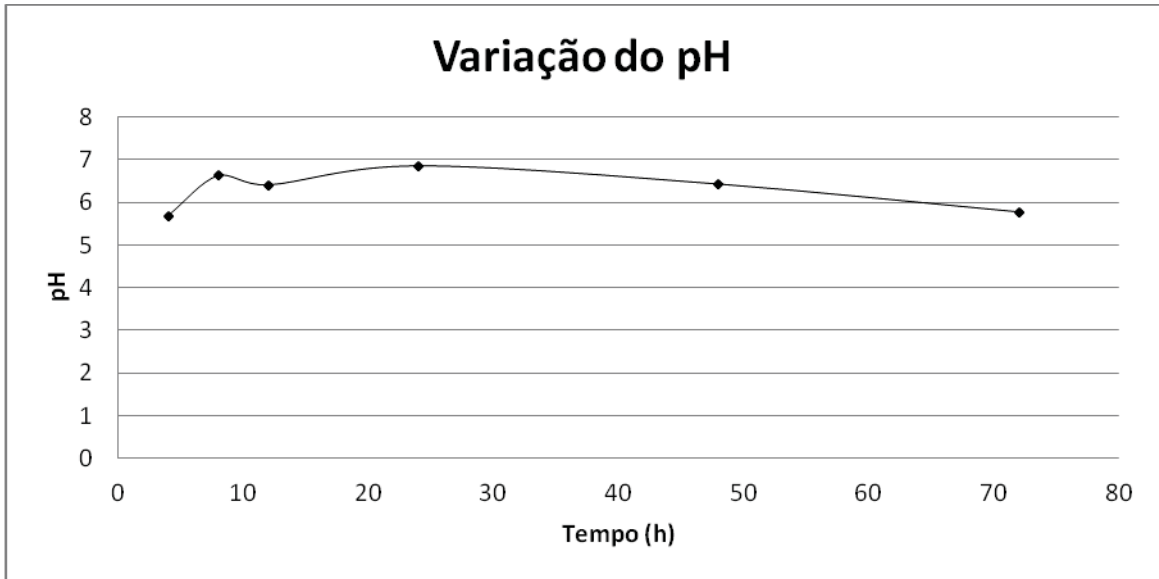


Figura 14 - Variação do pH ao longo da fermentação do *T. asahii* em fermentador de bancada 7L.

6. CONCLUSÕES

O extrato bruto obtido do cultivo de *T. asahii* demonstrou possuir compostos antimicrobianos sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir do fracionamento com solventes e determinação da CBM sobre *P. aeruginosa* e *X. campestris*, foi demonstrado que o composto antimicrobiano encontra-se na porção diclorometânica e não na hexânica.

A purificação do extrato diclorometânico através da cromatografia de troca-iônica demonstrou que o composto possui natureza aniônica, não protéica, provavelmente lipofílico.

O cultivo de *T. asahii* apresentou uma boa taxa de viabilidade e brotamento, com um bom crescimento e rendimento de biomassa.

Os valores de CBMs obtidos ainda são elevados, indicando que para uma possível aplicação biotecnológica será necessário maior grau de purificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-GABAL, M.; CHASTAIN, C. B.; HOGLE, R. M. *Pityrosporum pachidermatis* "canis" as a major cause of otitis externa in dogs. **Mykosen**, v. 22, p.192-199, 1979.
- AENDEKERK, S.; GHYSELS, B.; CORNELIS, P.; BAYSSE, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confer resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, p. 2371-2381, 2002.
- AGODI, A.; BARCHITTA, M.; CIPRESSO, R.; GIAQUINTA, L.; ROMEO, M. A.; DENARO, C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 7, p. 1155-1161, 2007.
- AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**, v. 125, p. 269-281, 1996.
- AMBLER, R. P.; COULSON, A. F.; FRERE, J. M.; GHUYSEN, J. M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S. G. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, n. 1, p. 269-70, 1991
- ANDRADE, A. E.; BLOCH JÚNIOR, C.; FELIX, G. C.; LIMA, L. H. C.; MEHTA, A.; MELO, J. A. T.; NORONHA, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, J. L.; ROSATO, Y. B. Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* na interação com a planta hospedeira Brassica olearacea. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa**, v. 93, 2005.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Ceppa**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANDREWS, M. D.; BURNS, M. Common tinea infections in children. **American Family Physician**, v. 77, n. 10, p. 1415-20, 2008.
- APERIS, G., MYRIOUNIS N., SPANAKIS E. K., MYLONAKIS E. Developments in the treatment of candidiasis: more choices and new challenges. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, p. 1319-36, 2006.
- ARRUDA, E. A. G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 31, p. 43, 1998.
- ASHBEE, H. R. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 14-23, 2006.
- ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; COELHO, R. S. B. Survival and Redistribution of *Bacillus* spp., Potential Biocontrol Agents of Black Rot, on Kale Phylloplane. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. China Agricultural University Press, Beijing, China, p. 347-353, 1996.

- ATLAS, R. M., **Handbook of Microbiological Media**. Ed. by Parks L., CRC Press, Inc., 1993.
- AZEVEDO, M. D. M. **Produção, purificação e determinação do efeito inibitório do extrato de *Trichosporon asahii* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae***. Assis, São Paulo, Brasil, 2011, 36p. (Monografia, Engenharia Biotecnológica – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Orientador – Pedro de Oliva Neto).
- AZEVEDO, M. D. M.; SHINYA, T. Y.; OLIVA-NETO, P. Produção, purificação e determinação do efeito inibitório do extrato de *Trichosporon asahii* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae*. In: 26o. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu - PR. **Anais do 26o. Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2011.
- BAILLON, H. **Traite de Botanique Medicale Cryptogamique**. Paris: Octave Doin, 234p., 1889.
- BAJAJ, B. K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal of Basic Microbiology**, 2012.
- BAJPAI, V. K.; KANG, S.; XU, H.; LEE, S. G.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Potential Roles of Essential Oils on Controlling Plant Pathogenic Bacteria *Xanthomonas* Species: A Review. **The Plant Pathology Journal**, v. 27, n. 3, p. 207 – 224, 2011.
- BARCHIESI, F.; MORBIDUCCI, V.; ANCARANI, F. *Trichosporon beigelii* fungaemia in an AIDS patient. **AIDS**, v. 7, p. 139-140, 1993.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**, 2ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
- BAXTER, M. *Pityrosporum pachydermatis* in pendulous and erect ears of dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 24, p. 69-70. 1975.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer-character in yeast. In: Genetics Today, **XIth International Congress of Genetics**, v. 1 (ed. Geerts, S. J.), p. 202-203, Pergamon Press, Oxford, 1963.
- BLAKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 588–594, 2006.
- BOND, R. *Malassezia pachydermatis* enfermedad dermatologica canina. **Waltham Focus**, v. 7, p. 27-31, 1997.
- BOND, R.; FERGUSON, E. A.; CURTIS, C. F.; CRAIG, J. M.; LLOYD, D. H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dog with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 103-107, 1996.

- BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E. M.; LLOYD, D. H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on health dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p.147-150, 1995.
- BONE, R. C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 57-68, 1993.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Aberystwyth: CAB International, 332p., 1986.
- BRAGA, K. A. M.; SOUSA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. **Microorganismos mais frequentes em unidades de terapia intensiva**. Revista médica Ana Costa. UFPB, 2004.
- BRIZUELA, M. A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. **Revista Iberoamericana de Micología, Espanha**, v. 15, p. 69-74, 1998.
- BUSH, K. Metallo β -lactamases: a class apart. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. S48-S53, 1998.
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 749-760, 2007.
- CABAÑES, F. J. Dermatophytes in domestic animals. **Revista Iberoamericana de Micología, Barcelona**, v. 17, p. 104-108, 2000.
- CABAÑES, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. In: REMÁN, J.; MANTÍN-MAZUELOS, E.; CALVO, M. C. R. (Eds). **Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica**. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, 2001.
- CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 1064-1076, 2007
- CABAÑES, F. J.; VEGA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Medical Mycology**, v. 49, n. 1, p. 40-8, 2011.
- CAFARCHIA, C.; ROMITO D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 327-331, 2006.
- CANNON, P. F. International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Part 1. **Microbiology Science**, v. 3, n. 6, p. 168-171, 1986.

- CAO, B.; WANG, H.; SUN, H.; ZHU, Y.; CHEN, M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 2, p. 112-118, 2004.
- CARVALHO, A. F. A.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; FERREIRA, H.; GOMES, E. Purification and Characterization of the α -Glucosidase Produced by Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 452-459, 2010.
- CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food hydrocolloids: Structures, properties and functions**, New York, Ed. Plenum Press, p. 135-140, 1994.
- CHAN, J.; GOODWIN, P. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, v. 17: p. 489 - 508, 1999.
- CHATZINIKOLAOU, I.; ABI-SAID, D.; BODEY, G. P.; ROLSTON, K. V.; TARRAND, J. J.; SAMONIS, G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 4, p. 501-509, 2000.
- CHEN, X. F., HUANG, C.; XIONG, L.; CHEN, X. D.; CHEN, Y.; MA, L. L. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 594–597, 2012.
- CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 385-405, 2008.
- CHOWDHARY A.; AHMAD S.; KHAN Z. U.; DOVAL, D. C.; RANDHAWA, H. S. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, p. 16-22, 2004.
- CHOY, M. H.; STAPLETON, F.; WILLCOX, M. D.; ZHU, H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1539-1546, 2008.
- CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C. T.; SCHWEIZER, H. P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 5036-5044, 2002
- CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 30-58-3063, 2001.
- COLEMAN, D. C.; RINALDI, M. G.; HAYNES, K. A.; REX, J. H.; SUMMERBELL, R. C.; ANAISSIE, E. J.; LI, A.; SULLIVAN, D. J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, p. 156-165, 1998.

- COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley's & Wilson's: microbiology and microbial infections**. 9ed., London: Oxford University Press, 766p., 1999
- COOPER, C. R. Yeasts pathogenic to humans. In: KORTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier, v. 5, 281p., 2011.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2ª ed. Rio de Janeiro : Medsi, 1992.
- CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M.; POMBO, G.; ESTEVINHO, L. Etiology of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens. **Acta Medica Portuguesa**, v. 20, n. 6, p. 543-550, 2007.
- COSTA, E. C.; SOUZA, C. M.; CAVALCANTE, M. A. Q.; FERNANDES, M. J; LIMA, D. M. M. Fungos queratinofílicos isolados de um parque escolar do Recife-PE. In: **Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica**, v. 52, n. 3, p. 259-260, 2002.
- COUTINHO, S. D. A. **Malassezia pachydermatis: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pele e meato acústico externo de cães**. São Paulo- SP, 1993. 108p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.
- COX, G. M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. In: AJELLO, L.; HAY, R. J. **Topley & Wilson's: microbiology and microbial infections**. 9ed., London: Oxford University Press, p. 460-484, 1999.
- DAX, S. L. **Antibacterial Chemotherapeutic Agents**. Blackie A & P, Londres, 1997.
- DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Cutaneous fungal infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Saunders Elsevier, Cap. 58, p. 550-569, 2006
- DIGNANNI M. C., SOLOMKIN J. S., ANAISSIE E. *Candida*. In: ANAISSIE, E., MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Medical Mycology**, 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.
- DONLAN, R. M. Biofilm formations: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1387-1392, 2001.
- DORING, G.; CONWAY, S. P.; HEIJERMAN, H. G.; HODSON, M. E.; HOIBY, N.; SMYTH, A.; TOUW, D. J. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. **European Respiratory Journal**, v. 16, n. 4, p. 749-767, 2000.
- DUBASH, T.; GUPTA, S.; PRAKASH, P. Y.; BAIRY, I. Isolation of Yeasts from Various Food Products and Detection of Killer Toxin Activity In vitro. **Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 407-411, 2010.

- DUTRA, M. **Avaliação do extrato do cultivo de *Trichosporon asahii*: inibição de *Pseudomonas aeruginosa* e toxicidade em camundongos**. Assis, São Paulo, Brasil, 2009 (Monografia, Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Orientador – Pedro de Oliva Neto).
- DWORECKA-KASAK, B.; TOKA, F. N. What's new about *Malassezia pachydermatis*. **Mikologia Lekarska**, v. 6, n. 3, p. 133-143, 1999.
- EICHENBERG, M. L.; APPELT, C. E.; BERG, V.; MUSCHNER, A. C.; NOBRE, M. O.; MATTA, D.; ALVEZ, S. H.; FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 75-80, 2003.
- ELEWSKI, B. E. Tinea capitis: A current perspective. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, p. 1-20, 2000.
- ELLNER, K.; MCBRIDE, M. E.; ROSEN, T.; BERMAN, D. Prevalence of *Trichosporon beigeli*. colonization of normal perigenital skin. **Journal of Medicine and Veterinary Mycology**, v. 29, p. 99-103, 1993.
- FAGUNDES JUNIOR, A. A P.; CARVALHO, R. T.; FOCACCIA, R.; FERNANDEZ, J. G.; ARAÚJO, H. B. N.; STRABELLI, T. M. V.; KOPEL, L.; LAGE, S. G. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em unidade de terapia intensiva cardiológica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 1, 2008.
- FALAGAS, M. E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 1, p. 7-15, 2006.
- FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO-FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu. p. 215-265, 2000.
- FERNÁNDEZ, M. L.; MÍGUEZ, A.; CACHO, E.; MARTÍNEZ, A. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. **Toxicon**, v. 34, p. 381-387, 1996.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Agronômica Ceres, São Paulo, p. 338, 2000.
- FLORENT, J. Los mohos. In: LEVEAU, J. Y.; BOUIX, M. **Microbiología industrial**. Los microorganismos de interés industrial. 1ª ed. Acribia, Zaragoza, p. 109-157, 2000.
- FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 10ªed. St. Louis: Mosby, p. 1074, 1998.
- FRASER, G. An etiology of otitis externa in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 6, p. 445, 1965.

- FRASER, G. *Pityrosporum pachydermatis* Weidman of canine origin. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 44, p. 441–448, 1961.
- FREDLUND E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNURER, J.; Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121, **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 395-402, 2002.
- FREITAS, A. C. **Desenvolvimento de novas tecnologias para produção de xarope de glicose a partir de amido**. Rio Claro, São Paulo, Brasil, 2012. (Dissertação, Microbiologia Aplicada – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Orientador – Pedro de Oliva Neto).
- FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 144p., 2007 (Tese em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 121p., 2004 (Dissertação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- FUENTEFRIA, A. M., SUH, S. O.; LANDELL, M. F.; FAGANELLO, J.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H., BLACKWELL, M.; VALENTE, P. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycology Research**, v. 112, p. 93-99, 2008
- GABAL, M. A. Antifungal activity of ketoconazole with emphasis on zoophilic fungal pathogens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 229-1234, 1986.
- GÁCSER, A.; STEHR, F.; KROGER, C.; KREDICS, L.; SCHAFFER, W.; NOSANCHUK, J. D.; Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 4710-4718, 2007.
- GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699-702, 2003.
- GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 183-190, 2001.
- GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Institution of Chemical Engineers**, v. 72, p. 227-237, 1994.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTO, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMES, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549 – 579, 2000.

- GARGEL, C. A. **Purificação do extrato de *Trichosporon asahii* e ação inibitória sobre *Pseudomonas aeruginosa***. Assis, São Paulo, Brasil, 2009 (Monografia, Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Orientador – Pedro de Oliva Neto).
- GARGEL, C. A.; ALBANO, M.; OLIVA NETO, P. Purificação do extrato de *Trichosporon asahii* e ação inibitória sobre *Pseudomonas aeruginosa*. In: 25o. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Ipojuca - PE. **Anais do 25o. Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2009.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. **An overview of the road map to the manual. Systematic Bacteriology**, 2nd ed, New York: Springer, 20p., 2000.
- GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848-854, 2005.
- GENTILINI, E.; DENAMIEL, G. A. A.; ESCALADA, J.; NEYRA, J. Otitis canina crônica hallazgos microbiológicos y sensibilidad a lós antibióticos. **Veterinaria Argentina**, v.8, p.113-117, 1991.
- GOLUBEV, W. I. **Antagonistic interactions among yeasts. The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts** (Rosa CA & Peter G, eds), p. 197-219, Springer, Berlin, Germany, 2006.
- GOLUBEV, W. I. Killer activity in *Cryptococcus humicola*. In: **VIIIth international symposium on Yeasts**, Atlanta, p. 178, 1992.
- GOLUBEV, W. I.; KULAKOVSKAYA, T. V.; GOLUBEVA, E. W. Antifungal glycolipid production in *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821. **Mikrobiologiya**, v. 70, p. 642-646, 2001.
- GOLUBEV, W. I. Mycocins (killer toxins). **The Yeasts. A taxonomy study** (Kurtzman CP & Fell JW, eds), p. 55-62, Academic Press, London, UK, 1998.
- 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.
- GRIFFIN, C. Limpeza e terapia tópica das otites. **A Hora Veterinária**, v. 94, p. 17-25, 1996.
- GUÉHO, E., SIMMONS, R.B., PRUITT, W.R., MEYER, S.A., AHEARN, D.G., 1987. Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1789–1790, 1987.
- GUÉHO, E.; BATRA, R.; BOEKHOUT, T. *Malassezia* Baillon (1889) In: KORTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier, v. 1, 281p., 2011.

- GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; de HOOG, G. S.; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, n. 1-2, p. 3-10, 1994.
- GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-355, 1996.
- GUÉHO, E.; SMITH, M. T.; de HOOG, G. S.; BILLON-GRAND, G.; CHRISTEN, R.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, p. 289-316, 1992.
- GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 37, p. 295-306, 1999.
- GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHEVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **Journal of Medical Mycology**, v. 6, p. 103-10, 1996.
- GUPTA, A. K.; KOHLI, Y. Evaluation of in vitro resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. **Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 375-380, 2003.
- GUTIÉRREZ, S.; CASQUEIRO, J.; MARTÍN, J. F. Filamentous fungi as cellular factories: biodiversity of secondary metabolites. **Revista Iberoamericana de Micología, Espanha**, v. 17, p. 54-60, 2000.
- HAINER, B. L. Dermatophyte infections. **American Family Physician**, v. 67, n. 1, p. 101-108, 2003.
- HAJJEH, R. A.; BLUMBERG H. M. Bloodstream infection due to *Trichosporon beigeli* in a burn patient: case report and review of therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 913-916, 2005.
- HANCOCK, R. E. W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. S93-S99, 1998.
- HAYWARD, A. C. The host of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1993.
- HEAD, N. E.; YU, H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 133-44, 2004.
- HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; THORSENLUMBSCHM, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE,

- J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K.; LICHTWARDT, R.; MOZLEY-STANDRIDGE, J. S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜBLER, V.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WESS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007.
- HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E. R.; HAMDAN, J. S.; LACHANCE, M. A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 623-627, 2004.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 446p., 2003.
- HOGARDT, M.; SCHMOLDT, S.; GOTTFRIED, M.; ADLER, K.; HEESEMANN, J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1057-1061, 2004.
- HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 1997-2005, 2001.
- IRVIN, R. T.; DORIN, P.; LEE, K. K.; SASTRY, P. A.; PRANCHYCH, W.; TODD, T.; HODGES, R.S. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesion: confirmation that the pili structural proteins subunit contains a human epithelial cell-binding domain. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 3720-3766, 1989.
- IZGU, F.; ALTINBAY, D. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on Gram-positive bacteria. **Microbios**, v. 89, p. 15-22, 1997.
- IZGU, F.; ALTINBAY, D.; TURELI, A. E. In vitro activity of panomicocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, v. 50, p. 31-34, 2006.
- JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 924-929, 1995.
- JALAL, S.; CIOFU, O.; HOIBY, N.; GOTOH, N.; WRETLIND, B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 710-12, 2000.

- JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, p. 275-282, 1975.
- JONES, R. N.; BARRY, A. L.; GAVAN, T. L.; WASHINGTON II, J. A. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: LENNETTE et al (ed). **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 972-977, 1985
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. A Pele e Seus Apêndices. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6ed., São Paulo: Manole, Cap. 17, p. 871 – 873, 2000.
- JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary Medical Micology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 3-28, 1972.
- KAPLAN, W. Piedra in lower animals; a case report of white piedra in a monkey and a review of literature. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 134, p. 113-117, 1959.
- KAPPE, R. Antifungal activity of the new azole UK-109,496 (voriconazole). **Mycoses**, v.42, n.2, p.83-86, 1999.
- KATO, Y.; OHASHI, H.; TSUTSUMI, Y.; MURAKAMI, T.; TAKAHASHI, Y. Prosthetic valve endocarditis caused by metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 24, n. 3, p. 347-349, 2009.
- KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 81-84, 1998.
- KAUFMAN, G.; BERDICEVSKY, I.; WOODFOLK, J. A.; HORWITZ, B. A. Markers for host – induced gene expression in *Trichopyton dermatophytosis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6584-6590, 2005.
- KENNIS, R. A.; ROSSER Jr, E. J.; OLIVER, N. B.; WALKER, R. W. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1048-1051, 1996.
- KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SCHLEIFER, K. H. Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 465 – 477, 1996.
- KING, D.; CHEEVER, L. W.; HOOD, A.; HORN, T. D.; RINALDI, M. G.; MERZ, W. G. Primary invasive cutaneous *Microsporum canis* infections in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 460-462, 1996.
- KISKA, O. L.; GILLIAN, P. H. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R.; BARON, F. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. Manual of clinical microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology. Washington, p. 516-526, 2003.

- KOHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPOUR, M.; HENZE, U.; GOTOH, N.; CURTY, L. K.; PECHERE, J. C. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 345-354, 1997.
- KOMSHIAN, S. V.; UWAYDAH, A. K.; SOBEL, J. D.; CRANE, L. R. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Infectious Diseases**, v. 2, p. 379-390, 1989.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERCKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5 ed, Medsi, 2001.
- KONTOYIANNIS, D. P.; TORRES, H. A.; CHAGUA, M.; HACHEM, R.; TARRAND, J. J.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 564-569, 2004.
- KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H.; **Química Farmacêutica**, Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1988.
- KOSSUGA, M. H.; LIRA, S. P.; NASCIMENTO, A. M.; GAMBARDELLA, M. T. P.; BERLINCK, R. G. S.; TORRES, Y. R.; NASCIMENTO, G. G. F.; PIMENTA, E. F.; SILVA, M.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R. M. Isolation and biological activities of secondary metabolites from the sponges *Monanchora* aff. *arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidies*, from the ascidian *Didemnum ligulum* and from the octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1194-1202, 2007.
- KOWALESWSKA-GROCHOWSKA, K. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. **Chest Journal**, v. 100, p. 1090-1095, 1991.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**, Elsevier, 3ed, Amsterdam. 1028p., 1984.
- KULAKOVSKAYA, T. V.; GOLUBEV, W. I.; TOMASHEVSKAYA, M. A.; KULAKOVSKAYA, E. V.; SHASHKOV, A. S.; GRACHEV, A. A.; CHIZHOV, A. S.; NINFATIEV, N. E.; Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. **Mycopathologia**, v. 169, p. 117-123, 2010.
- KURAHASHI, K.; KAJIKAWA, O.; SAWA, T.; OHARA, M.; GROPPER, M. A.; FRANK, D. W.; MARTIN, T. R.; WIENER-KRONISH, J. P. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 743-750, 1999.

- KWON-CHUNG, K. J.; LEHMAN, D.; GOOD, C.; MAGEE, P. T. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infectious Immunology**, v. 49, p. 571-575, 1985.
- LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, cap.38, p. 616-651, 1991.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, p.278-181, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 1104p., 2003.
- LARSH, H. W. The prevalence and the drug resistance of *H. capsulatum* and *C. albicans* with pulmonary histoplasmosis. **Laboratory Investigation**, v. 11, p. 1140-1145, 1962.
- LARSSON, C. E.; LARSON, M. H. M. A.; AMARAL, R. C.; GANDRA, G. R. P.; HAGIWARA, M. K.; FERNANDES, W. R. Dermatitis in dogs caused by *Mallassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinaria**, v. 4, n. 1, p. 63-68, 1988.
- LAURETTI, L; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of blavim, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.
- LEE, S. S.; TOBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.; DE LEY, J. The rostr range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 308-355, 1984.
- LI, X. Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1732-1741, 1994.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1948-1953, 1995.
- LI, X. Z.; ZHANG, L.; POOLE, K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 433-436, 2000.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 634-340, 2002.

- LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 247-250, 2001.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology**, v. 8, p. 557-584, 1995.
- LOBELL, R.; WIENGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite canina. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 88, p. 29 -33, 1995.
- LODISE, T. P.; MILLER, C. D.; GRAVES, J.; FURUNO, J. P.; MCGREGOR, J. C.; LOMAESTRO, B.; GRAFFUNDER, E.; MCNUTT, L. A. Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 417-22, 2007.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 1066-1076, 2000.
- LYMAN, C. A.; DEVI, S. J.; NATHANSON, J.; FRASCH, C. E.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J.; Detection and quantification of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli* and implications for pathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 126-130, 1995.
- MACHADO, M. L.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L., GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clinica Veterinária**, v 44, p. 27-34, 2003.
- MADARIAGA, M. G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5827-5829, 2003.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, Ed. Artmed, Porto Alegre/RS, 12ed, 1160p., 2010.
- MAI, G. T.; SCOW, W. K.; PIER, G. B.; McCORMACK, J. G.; THONG, Y. H. Suppression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 559-564, 1993.
- MANNERS, J. G. **Principles of Plant Pathology**. 2ed., Cambridge University Press, 1993.
- MANSILLA, E. C.; GARROTE, F. G. Mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Clínica Espanhola**, v. 198, p. 10-16, 1998.
- MARTINEZ-LACASA, J.; MANA, J.; NIUBO, R.; RUFÍ, G.; SAEZ, A.; FERNÁNDEZ-NOGUÉS, F. Long-term survival of a patient with prosthetic valve endocarditis due to *Trichosporon beigeli*. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 10, p. 756-758, 1991.

- MARTINS, A. A.; ROSA, C. S.; NASCENTE P. S.; SOUZA, L. L.; SANTOS, D. V.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80 para identificação das espécies do gênero *Malassezia*. In: **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica**. Pelotas – RS, 2004.
- MASEDA, H.; YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 658-664, 2000.
- MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, T.; NISHINO, T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3322-3327, 2000.
- MATHEWS, R. C. Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? **Microbiology**, v. 140, p. 1505-1511, 1994.
- MCPHEE, J. B.; TAMBER, S.; BAINS, M.; MAIER, E.; GELLATLY, S.; LO, A.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. The major outer membrane protein OprG of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to cytotoxicity and forms an anaerobically regulated, cation-selective channel. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 2, p. 241-247, 2009
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 201, p. 71-115, 2009.
- MENEGHIN, M. C.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Inhibition of Bacteria Contaminating Alcoholic Fermentations by Killer Yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1043-1050, 2010.
- MENEZES, C. H. P.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratório Clínico**. Revinter, Rio de Janeiro, 1ed., 387p., 2006.
- MERINO, L. A. *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterium with multiple personalities. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 39, n. 3, p.143, 2007.
- MEYER, D. F.; BOGDANOVE, A. J. **Genomics-driven advances in Xanthomonas biology. Plant Pathogenic Bacteria – Genomics and Molecular Biology**. Ed.:Jackson, R.W. Caiste Academic Press. Norfolk, Reino Unido, p. 147-161, 2009.
- MIDDELHOVEN, W. J.; SCORZETI, G.; FELL, J. W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeasts genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 975-986, 2004.
- MIDGLEY, G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. **Medical Mycology**, v. 38, p. 9-16, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p.426, 1959.

- MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 415-417, 1999.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727-37, 1999.
- MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de Robbins & Cotran patologia**. Ed. Elsevier 7^a Ed, 2006.
- MOET, G. J.; JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; STILWELL, M. G.; FRITSCH, T. R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrob Surveillance Program (1998-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, n. 1, p. 7-13, 2007.
- MORAES, A. P.; MACHADO, A. A. L.; MEDEIROS FILHO, P.; REIS, C. M. S. Pseudomicetoma dermatofítico: relato de um caso devido a *Tricophyton tonsurans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 291- 294, 2001.
- MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **European Society of Veterinary Dermatology**, v. 15, p. 99-107, 2004.
- MORRIS, E. R. Polysaccharide rheology and in mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Application**, 654p., 1995.
- MOSKOWITZ, S. M.; ERNST, R. K.; MILLER, S. I. PmrAB, a Two-Component Regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 575-579, 2004.
- MUGNIER, P.; DUBROUS, P.; CASIN, I.; ARLET, G.; COLLATZ, E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2488-2493, 1996.
- NAIJA, W.; MATEO, J.; RASKINE, L.; TIMSIT, J. F.; LUKASCEWICZ, A. C.; GEORGE, B.; PAYEN, D.; MEBAZAA, A. Case report: greater meningeal inflammation in lumbar than in ventricular region in human bacterial meningitis. **Critical Care**, v. 8, n. 6, p. R491-494, 2004.
- NAKAJIMA, S.; FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T. Xanthan gum production in a fermentor with twin impellers. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 6, p. 392-397, 1990.
- NASCENTE, P. S. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade in vitro e in vivo frente a antifúngicos**. Porto

- Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2006. (Tese em Ciências Veterinárias - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- NESS, M. J.; MARKIN, R. S.; WOOD, R. P.; SHAW, B. W.; WOODS, G. L. Disseminated *Trichoporon beigeli* infection after orthotopic liver transplantation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 92, p. 199-223, 1989.
- NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia oral e maxilofacial**, cap. 6, 2a ed., Editora Guanabara Koogan, 2004.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.
- NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian journal of Microbiology**, v. 32, p. 245-249, 2001.
- NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 128-131, 1998.
- NORDMANN, P.; RONCO, E.; NAAS, T.; DUPORT, C.; MICHEL-BRIAND, Y.; LABIA, R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 962-969, 1993.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1959-1967, 2001.
- OKAMOTO, K.; GOTOH, N.; NISHINO, T. *Pseudomonas aeruginosa* reveal high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1964-1971, 2001.
- OSBOURN, A. E. Pathogenicity of Black Rot Bacterium *Xanthomonas campestris* pathovar. *campestris* to Crucifers. In: SINGH, U. S.; SINGH, R. P.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases**. Editora Pergamon, v. I: Prokaryotes, p. 153-165, 1995.
- OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 128-134, 2006.
- PALLERONI, N. J.; BALLARD, R. W.; RALSTON, E.; DOUDOROFF, M. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 1, p. 1-11, 1972.
- PEREIRA, D. B.; MEIRELES, M. C. A. Doenças causadas por fungos e oomycetos: Dermatofitoses. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela. Cap. 4, 2ed., v. 1, p. 367-373, 2001.

- PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2005.
- PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **Journal of Hospital Infection**, v. 30, p. 329-338, 1995.
- PITOUT, J. D.; CHOW, B. L.; GREGSON, D. B.; LAUPLAND, K. B.; ELSAYED, S.; CHURCH, D. L. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 294-298, 2007.
- PIWOZ, J. A.; STADTMAUER, G. J.; BOTTONI, E. J.; WEITZMAN, I.; SHLASKO, E.; CUMMINGHAM-RUNDLES, C. *Trichosporon inkin* abscesses presenting as a penetrating chest wall mass. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 19, n. 10, p. 1025-1027, 2000.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid – and – integron –borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.891-897, 2000.
- POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practices of Infectious Diseases**. Philadelphia, Churchill Livingstone, p. 2310-2335, 2000.
- POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, p. 979-984, 1983.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.
- POOLE, K.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, H.; ZHAO, Q.; WADA, A.; YAMAGASHI, T.; NESHAT, S.; YAMAGASHI, J.; LI, X. Z.; NISHINO, T. Overexpression of the MexC-MexD-OprJ efflux operon in nfxB-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 713-724, 1996.
- POOLE, K.; KREBES, K.; MCNALLY, C.; NESHAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7363-7372, 1993.
- PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.. ROCHA, M. F. G. *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v. 102, n. 563-564, p. 207-214, 2007.
- PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J.D . **Terapêutica antimicrobiana veterinária**. Zaragoza: Acribia. Cap.15: Quimioterapia antifúngica: p.309-330, 1991.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 7-14, 1982.

- PROHIC, A. Psoriasis and *Malassezia* Yeasts, In: O' DALY, J. **Psoriasis - A Systemic Disease**, InTech, 216p., 2012.
- 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.
- QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.; HE, Y.; FENG, J.; LU, L.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B.; ZENG, S.; GU, W.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G.; TANG, J.; HE, C. Comparative and functional genomic analysis of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, p. 757 - 767, 2005.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.
- REX J. H. Editorial response. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 467-470, 1996.
- REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1-8, 1995.
- RICHARD, J. L.; DEBEY, M. C.; CHERMETTE, R.; PIER, A. C.; HASEGAWA, A.; LUND, A.; BRATBERG, A. M.; PADHYE, A. A.; CONNOLE, M. D. Advances in veterinary mycology. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, Suppl 1, p.169-187, 1994.
- RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection – Diagnosis and management**. London : Blackwell, cap.3: Antifungal drugs, p. 17-43, 1993.
- RIPPON, J. W. **Medical micology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 3^{ed}, 1988.
- RODRIGUES NETO, J. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 183, p. 56 - 59, 1995.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELLADO, E.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 58, p. 435-440, 2005.
- ROSA, C. S.; MARTINS, A. A.; SANTIN, R.; FARIA, R. O.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MADRID, I. M.; NASCENTE, P. S. *Malassezia pachydermatis* in tegumentary and external acoustic meatus from healthy, with otitis and dermatopathies felines from Pelotas city, RS State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v 34, n. 2, p. 143-147, 2006.

- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo, Atheneu, 2005.
- SAADATZADEH, M. R.; ASHBEE, H. R.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* in vitro. **Medical Mycology**, v. 38, p. 487-493, 2001.
- SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in Antifungal Therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 361-379, 2008.
- SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. M. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.
- SALLEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSIAN, H.; LEE, Y.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: na update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.
- SANTANA, D. P.; RODRIGUES, T.; SOUZA, S. O.; NAVES, P. L. F.; RIBEIRO, E. L. Prevalência de fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças portadoras e não portadoras de síndrome de down. **Enciclopedia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2010.
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. **Yeast**, v. 21, p. 151-162, 2004b.
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, p. 2527-2534, 2004a.
- 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.
- SANTOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some Aspects of Dermatophytoses Seen at University Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 39, p. 137-140, 1997.
- SANTOS-FILHO, L. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 79-84, 2002.
- SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (Wedelia paludosa)**

- (**Asteraceae**). Itajaí, Santa Catarina, Brasil, 2005, p. 81 (Dissertação em Ciências Farmacêuticas - Universidade do vale do Itajaí, Centro de ciências da saúde).
- SATISH, S.; RAVEESHA, K. A.; JANARDHANA, G. R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 145-147, 1999
- SAWA, T.; OHARA, M.; KURAHASHI, K.; TWINING, S. S.; FRANK, D. W.; DOROQUES, D. B.; LONG, T.; GROPPER, M. A.; WIENER-KRONISH, J. P. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3242 – 3249, 1998.
- SCHLOTTFELDT, F. S.; TRAMONTIN, S. W.; NAPPI, B. P.; SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, 2002.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 257-276, 2002.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 212-221, 2006.
- SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3a Ed. New York: Ed. Springer, 1994.
- SCOTT, D. W.; HORN, R. T. Jr. Zoonotic dermatoses of dogs and cats. The Veterinary Clinics of North America. **Small Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 117-144, 1987.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, G. E. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**. Philadelphia: Saunders. 6a edição, 1528 p., 2001.
- SENER, L. **Otimização da produção da purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para o desenvolvimento de um novo agente antifúngico**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 57p., 2010 (Dissertação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- SENER, L.; RIBAS, R. K. C.; VALENTE, P. Optimization of the cultivation conditions for the production of an antimicrobial compound by *Trichosporon japonicum* QU139. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, n. 1, p. 72-76, 2011.
- SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M. P.; DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 41-49, 2004.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Média à Luz de Autores Contemporâneos**. São Paulo, Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA, A. R. **Estudo microbiológico de linhagens fúngicas e bacterianas com propriedades antibióticas inibitórias de *Pseudomonas aeruginosa***. Assis, São Paulo, Brasil, 2007, 43p. (Monografia, Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas).
- SILVA, C. R. R. **Estudo das condições de produção de xantana através de diferentes formulações de meio de cultura**. Assis, São Paulo, Brasil, 2004, 30p., (Monografia, Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas).
- SILVA, N.; RADHOUANI, H.; GONCALVES, A.; ARAUJO, C.; RODRIGUES, J.; IGREJAS, G.; POETA, P. In vitro activity of ceftobiprole against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from humans and animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 801-803, 2010.
- SIMMONS, R. B.; GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycology Resource**, v. 94, p. 1146-1149, 1990.
- SKINDERSOE, M. E.; ALHEDE, M.; PHIPPS, R.; YANG, L.; JENSEN, P. O.; RASMUSSEN, T. B.; BJARNSHOLT, T.; TOLKER-NIELSEN, T.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3648-63, 2008.
- SOLL, D. R. *Candida albicans* biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology**, v. 18, p. 717-720, 2008.
- SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, 2000.
- SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, Washington DC, 1976.
- STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 159-271, 1966.
- STANZANI, M.; TUMIETTO, F.; GIANNINI, M. B.; BIANCHI, G.; NANETTI, A.; VIANELLI, N.; ARPINATI, M.; GIOVANNINI, M.; BONIFAZI, F.; BANDINI, G.; BACCARANI, M. Successful treatment of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis after allogeneic bone marrow transplantation with a combination of colistin and tigecycline. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1692-1695, 2007.
- STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Ed. Artmed, 2004.

- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-24, 2004.
- SUGITA, T.; ICHIKAWA, T.; MATSUKURA, M.; SUEDA, M.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Genetic Diversity and Biochemical Characteristics of *Trichosporon asahii* Isolated from Clinical Specimens, Houses of Patients with Summer-Type Hypersensitivity Pneumonitis, and Environmental Materials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2405-2411, 2001
- SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1985-1993, 1999.
- SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T.; HIKARU, K. Taxonomic position of deepseated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1368-1370, 1995.
- SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 48, p. 579-483, 2004.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; RYOJI, T.; NISHIKAWA, A. description of a new species *Malassezia japonica* and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4695-4699, 2003.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from a patient with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.
- SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characterization and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 329-334, 1998.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 363-388, 1993.
- TAPIA, C. P. Retrato Microbiológico. **Revista Chilena de Infectología**. Santiago, v. 26, n. 3, 2009.

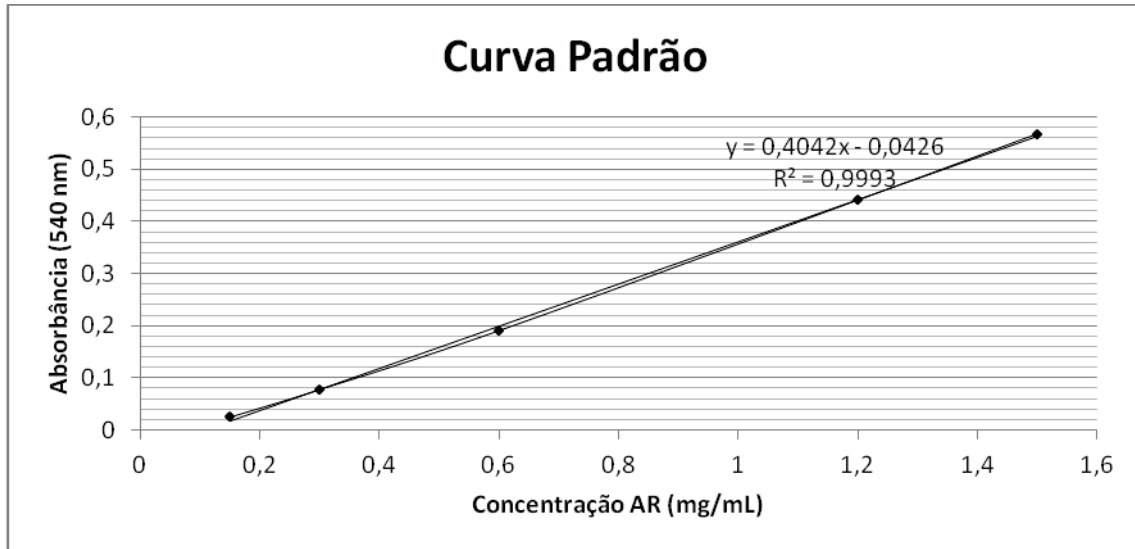
- TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- TOLEDO, M. C. F.; CAMARGO, M. S. F. O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, 1998.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 01p, p.607, 2005.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. Atheneu, p.718, 2005.
- TRIAS J.; NIKAIDO, H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 52-57, 1990
- TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUCK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.
- VASINAUSKIENE, M.; RADUSIENE, J.; ZITIKAITE, I.; SURVILIENE, E. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. **Agronomy Research**, v. 4, p. 437-440, 2006.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995.
- VIDOTTO, V.; PONTON, J.; AOKI, S.; QUINDOS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 70-74, 2002.
- VUYST, L. De.; LOO, J. V.; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 263-273, 1987.
- WANG, X.; CHI, Z.; YUE, L.; LI, J.; LI, M. WE, L. A marine killer yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. **Microbiology Research**, v. 162, p. 77-85, 2007.
- WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 213-222, 1995.
- WALLING, D. M.; MCGRAW, D. J., MERZ, W. G.; KARP, J. E.; HUTCHINS, G. M. Disseminated infection with *Trichosporon beigelii*. **Infectious Diseases**, v. 9, p. 1013-1019, 1987.

- WALLIS, A. F. A.; WEARNE, R. H. Analysis of resin in eucalypt woods and pulps. **Appita Journal**, v. 52, n. 4, p. 255-299, 1999.
- WALSH, T. J.; MELCHER, G. P.; LEE, J. W.; PIZZO, P. A. Infectious due *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 5, p. 79-113, 1993.
- WARNOCK, D. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 41, p. 95-105, 1998.
- WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 147-151, 1991.
- WATSON, K. C.; KALLICHURUM, S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 191-193, 1970.
- WEIDMAN, F. D. Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). with description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. **Report of Laboratory and Museum of Comparative Pathology of the Zoological Society**, v. 53, p. 36-44, 1925.
- WEILER, F.; SCHMITT, M. J.; Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effects on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v. 3. P. 69076, 2003.
- WELBEL, S. F.; MCNEIL, M. M.; PRAMANICK, A. Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 13, p. 104-108, 1994.
- WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, São Paulo, v. 64, n. 8, p. 736-742, 1980.
- WOODFOLK, J. A. Allergy and dermatofytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.1, p. 30-43, 2005.
- WOOLLETT, L. L.; HENDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 36, p. 427-435, 1970.
- XAVIER, M. O.; NASCENTE, P. S. Malasseziose em cães e gatos: uma revisão. **Prêmio de Pesquisa Waltham**, p. 12-19, 2003.
- XU, J.; SAUNDERS, C. W.; HU, P.; GRANT, R. A.; BOEKHOUT, T.; KURAMAE, E. E.; KRONSTAD, J. W.; DEANGELIS, Y. M.; REEDER, N. L.; JOHNSTONE, K. R.; LELAND, M.; FIENO, A. M.; BEGLEY, W. M.; SUN, Y.; LACEY, M. P.; CHAUDHARY, T.; KEOUGH, T.; CHU, L.; SEARS, R.; YUAN, B.; DAWSON, T. L. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 18730-18735, 2007.

- YAMANO, Y.; NISHIKAWA, T.; KOMATSU, Y. Outer membrane proteins responsible for the penetration of beta-lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, p. 175-184, 1990.
- ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.
- ZAITS, C.; PROENÇA, N. G. Estado atual da taxonomia dos dermatófitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 5, p. 403-406, 1988.
- ZAVASCKI, A. P.; GOLDANI, L. Z.; GONCALVES, A. L.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 2, p. 343-345, 2006.
- ZHAO, Y.; DAMICONE, J. P.; BENDER, C. L. Detection, survival and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. **Plant Disease**, v. 86, p. 883-888, 2002.

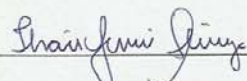
ANEXOS

ANEXO A - Curva de calibração para realização do teste de açúcares redutores com DNS.



Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 26 / 11 / 2012



Assinatura