



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**EWERTON WESLLEY CARACAS CEDRO**

**Atividade de um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis*  
sobre células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp.**

**FORTALEZA – CE**

**2016**

**EWERTON WESLEY CARACAS CEDRO**

**Atividade de um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis*  
sobre células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro.

**FORTALEZA – CE**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C385a Cedro, Ewerton Wesley Caracas.  
Atividade de um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis* sobre células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp. / Ewerton Wesley Caracas Cedro. – 2016.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. *Trichosporon*. 2. Biofilmes. 3. *Bacillus subtilis*. I. Título.

CDD 616.9

---

**EWERTON WESLLEY CARACAS CEDRO**

**Atividade de um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis*  
sobre células planctônicas e biofilmes de *Trichosporon* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: \_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª Drª Vânia Maria Maciel Melo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Ao meu avô Luís Alves Caracas (*in  
memoriam*). Grande pai, avô e amigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual é Autor e Consumador da minha fé! Sem Ele não sou nada, com Ele posso todas as coisas! “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.” Rm. 11:36.

Agradeço a minha mãe, a qual sempre acreditou em mim e sonhou com um momento importante como este. Nunca mediu esforços para me oferecer a melhor educação. Lembro de todas as dificuldades que passamos e ela sempre com um sorriso no rosto. Nunca desistiu, nunca se entregou. Tive o melhor exemplo de pessoa guerreira dentro da minha casa! Obrigado por ter sido essa mãe exemplar e companheira. Obrigado mãe! Eu te amo muito! A Helder Nanúncio, seu esposo. Obrigado por tantas vezes me ajudar e se orgulhar de mim.

À minha querida e amada esposa Vanessa Caracas. Obrigado por sempre estar ao meu lado. Obrigado por ter dado o incentivo certo, na hora certa para que eu pudesse correr atrás do meu sonho e do que eu realmente amo. Obrigado por sonhar junto, por me amar e sempre acreditar em nós. Obrigado pelo filho lindo que você me deu! “Douka itsumo genki de waratte ete hoshi i”. Eu te amo, meu amor!

Ao meu filho Carlos Wesley, amor meu. Você é o meu herói! A cada dia tento ser uma pessoa melhor para que um dia você olhe para mim e possa se orgulhar. Você é uma bênção na minha vida!

Ao meu pai João Cedro. Que embora distante a centenas de km, me acompanha e me vê desenvolver, sempre tendo muito orgulho de mim.

Aos meus irmãos Najarah e Igor Caracas. Que Deus possa abençoar seus caminhos e que em tudo, lembrem-se Dele.

Aos meus avós Luís Alves Caracas (*in memoriam*) e Risalva Caracas Vieira, por terem sido tão fundamentais na minha formação acadêmica. O caráter de vocês é um orgulho para mim. Foi com o meu avô que aprendi que quando um homem dá sua palavra, ele não deve voltar atrás. E foi com esse caráter que eu fui sendo moldado.

Aos meus tios Luís Rocildo, José Caracas Vieira (*in memoriam*), Luís Carlos Caracas (*in memoriam*), Neila Maria e Ana Cláudia Caracas Vieira, e a todos os meus primos (as) por sempre acreditarem em mim e me darem todo o incentivo possível. Minha família é a melhor do mundo!

Obrigado professora Dra. Rossana, por tudo! Por todos os ensinamentos, todas as conversas, quer seja em sua sala, ou na salinha do café. Independentemente do local, uma conversa com a senhora é sempre um momento de excelentes aprendizagens. Quem dera um dia eu consiga ser metade do profissional que és! Obrigado por toda a paciência e por ter acreditado em mim. Obrigado pela compreensão e toda a preocupação comigo e com minha esposa quando ela estava grávida e tomamos aquele susto. Obrigado também por todo o carinho com meu filho. Professora Rossana a senhora é incrível!

Agradeço a todos os professores do CEMM. Aos professores Júlio Sidrim e Marcos Fábio por terem dedicado as suas vidas à ciência para que um dia, eu pudesse estar realizando um sonho como este. Nada disso seria possível se os senhores não tivessem nos dado toda essa estrutura. Também a professora Sâmia Brilhante por todo o apoio. Sempre que precisei a senhora estava lá pronta a me ajudar. A professora Débora que também foi fundamental para essa pesquisa. Obrigado por todas as conversas e por meio dessas, os ensinamentos que vieram.

Obrigado professora Vânia Melo. Não só por ser uma pesquisadora incrível, mas também uma excelente pessoa. Adorei todas as vezes que pudemos conversar e ver o quanto a senhora é motivada pela pesquisa. Abraço a todos do LEMBIOTECH.

A Silvine por toda ajuda prestada. Você foi sempre uma pessoa com quem pude contar. Muito obrigado!

Aos Doutores Lucas Alencar e Manoel Paiva, por terem composto a minha banca de qualificação. Vocês me ajudaram muito! Obrigado por todas as considerações. Vocês são duas pessoas nas quais eu me espelho, pois vejo que amam o que fazem.

As técnicas do laboratório Terezinha de Jesus (Tetê) e Gláucia. Nem sei o que seria de mim sem vocês! Perdi as contas de quantas vezes me ajudaram. Obrigado Tetê por ter sido essa “mãezona”, sempre querendo o meu bem. Obrigado por todas as aprendizagens que você me proporcionou. Gláucia, obrigado por todas as vezes que você chegava e perguntava: “Wewé, como estão indo as coisas?”. E dali saía uma força que você me dava. Você não sabia, mas as vezes as coisas não estavam indo bem. Mas no final foi como você sempre falou: “vai dar certo wewé. O final é sempre assim, corrido. Mas no fim dá tudo certo”. Também a secretária Carolinda Soares, obrigado!

Agradeço a toda a equipe de IC's, mestrandos e doutorandos do CEMM. Vocês são a melhor equipe do mundo! Obrigado Patrícia e Raquel que me ajudaram diretamente, obrigado

Jônatas por sua disponibilidade e prestatividade... obrigado a todos (as)! Obrigado por serem IC's tão queridos! Jonathas (Jow), que primeiramente me deu todo o apoio para que essa conquista fosse realizada. Lucilene e Lana por sempre estarem dispostas a me ajudar no que precisasse, mesmo que fossem os tão disputados horários no fluxo. Vandbergue, nem sei o que seria de mim sem sua ajuda, rapaz! Muito obrigado por ter disposto do seu tempo para me ajudar, principalmente nessa reta final. Kleybson, meu parceiro. Valeu por toda a força e torcida. Estamos juntos nessa. Lívia, obrigado por toda a torcida e ajuda sempre que precisei.

Ana Luiza, obrigado pela disposição. Felipe, valeu pela torcida. Sucesso para você também! Edmilson, cara de Cabo Verde. Gosto muito de você cara. Sempre com um sorriso no rosto, mesmo em meio a tanta dificuldade. Glautemberg, um grande amigo que o mestrado me deu. Obrigado cara! Ao Jaime (yo no lo conozco, señor) e Crister, “amigos internacionais”. Obrigado também Giovanna, Jamille, Gleiciane, vocês são pessoas incríveis.

Agradeço também a Rosana Serpa, que foi de fundamental importância para esta pesquisa. Lembro de você me ensinando os primeiros passos, com toda a paciência do mundo. Tenho certeza que logo, logo, você realizará todos os seus sonhos e será uma grande professora. Ao Tony, por ter me ajudado desde o começo, também me ajudando desde os primeiros passos. Muito obrigado!

A toda equipe do LIO e do LPN, por sempre se prontificarem a me ajudar quando necessário.

Obrigado a CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

Obrigado por me fazerem tão feliz!

“Eu sou a videira; vocês são os ramos. Se alguém permanecer em mim e eu nele, esse dá muito fruto; pois sem mim vocês não podem fazer coisa alguma”. João 15:5.

## RESUMO

Nos últimos anos, estudos tem dado relevância a *Trichosporon*, considerando-o um gênero com espécies patogênicas oportunistas emergentes em pacientes acometidos por malignidades hematológicas. Dentre os fatores de virulência expressos por essas espécies patogênicas, destaca-se a formação de biofilmes, os quais mostram tolerância aos antifúngicos de uso terapêutico. Novas medidas eficazes de terapia se tornam necessárias. Biossurfactantes demonstram ser uma alternativa viável, por existirem estudos que comprovem a sua baixa toxicidade e redução da tensão superficial do meio. Assim, objetivou-se investigar o efeito de um biossurfactante (TIM96) de *Bacillus subtilis* frente a células planctônicas e sésseis de *Trichosporon*. Para tanto, foi avaliada a sensibilidade de cepas clínicas de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=7), por meio do teste de microdiluição em caldo. Como controle, foi avaliada a sensibilidade das cepas frente a anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e voriconazol (VCZ), além da interação entre o surfactante e os antifúngicos supracitados. Investigou-se o tempo de morte das células fúngicas expostas ao TIM96 por análises do número de unidades formadoras de colônia (UFC), além do efeito sob o teor de ergosterol, danos às membranas fúngicas e hidrofobicidade em células planctônicas. A atividade inibitória do TIM96 frente à formação de biofilmes, bem como frente a biofilmes maduros, foi avaliada por análises espectrofotométricas de viabilidade celular e biomassa, além de microscopia confocal com corantes vitais. Por fim, a toxicidade do TIM96 foi avaliada em cultura de macrófagos murinos. Os valores de CIM do TIM96 variaram de 78,125 a 312,5 µg/mL; para os antifúngicos os valores de CIM variaram de 0,125 a 2 µg/mL para AMB; 1 a 8 µg/mL para FLC e 0,0312 a 0,125 µg/mL para VCZ. TIM96 em combinação com antifúngicos, apresentou indiferença farmacológica, com antagonismo. A curva de morte revelou que o declínio do número de colônias ocorreu após 6 horas de contato com o surfactante, com morte absoluta após 24 horas. Em concentrações sub-inibitórias, TIM96 reduziu o teor de ergosterol celular, a permeabilidade da membrana e alterou a hidrofobicidade superficial das células planctônicas de *Trichosporon*. TIM96 reduziu a adesão celular em até 96,89% e reduziu 99,2% da atividade metabólica do biofilme maduro. Concentrações de TIM96 que variaram de 78,125 a 5000 µg/mL, apresentaram toxicidade às células de macrófagos murinos. Os resultados abrem perspectivas para a descoberta de novas estratégias antifúngicas.

**Palavras-Chave:** *Trichosporon*, biofilmes, *Bacillus subtilis*.

## ABSTRACT

In recent years, studies have given relevance to *Trichosporon*, a fungal genus that includes emerging opportunistic pathogenic species that infect patients presenting hematological malignancies. Among the virulence factors expressed by these fungal species, biofilm formation stands out, a cell community that presents tolerance to antifungal agents for therapeutic use. New effective therapeutic measures become necessary. Biosurfactants showed to be a viable alternative as they present low toxicity and reduction of the surface tension of the medium. Thus, the present study aimed to investigate the effect of a biosurfactant (TIM96) produced by *Bacillus subtilis* on planktonic and sessile cells of *Trichosporon* spp. For this, susceptibility of clinical strains of *T. asahii* (n = 4) and *T. inkin* (n = 6) was evaluated by the broth microdilution test. Susceptibility of the strains against TIM96, amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC) and voriconazole (VCZ) was evaluated, as well as the interaction between the surfactant and the antifungal agents. Time-kill curve assay was evaluated with fungal cells exposed to TIM96 through analysis of the colony forming units (CFU). The effect of TIM96 on ergosterol content, damage to fungal membranes and cell hydrophobicity in planktonic cells were also evaluated. The inhibitory activity of TIM96 against biofilm formation as well as mature biofilms was evaluated using polystyrene microplate and spectrophotometric analyzes of cell viability and biomass were performed, as well as confocal microscopy. Finally, the toxicity of TIM96 was evaluated in murine macrophages culture. MIC values of TIM96 ranged from 78.125 to 312.5 µg/mL; for antifungals, MIC values ranged from 0.125 to 2 µg/mL for AMB; 1 to 8 µg/mL for FLC and 0,0312 a 0,125 µg/mL for VCZ. When tested in combination with antifungals, pharmacological indifference and antagonism were observed. Time-kill curve revealed that the decline in the number of colonies occurred after 6 hours of contact with the surfactant, with total death occurring after 24 hours. TIM96 at subinhibitory concentrations reduced the cell ergosterol content, also altering membrane permeability and surface hydrophobicity of planktonic cells of *Trichosporon*. Incubation with TIM96 in 10XMIC reduced cell adhesion up to 96.89%, interfering with the formation of biofilms. This concentration also interfered with mature biofilms with a reduction of metabolic activity up to 99.2%. Concentrations of TIM96 ranging from 78,125 to 5000 µg/mL showed toxicity to murine macrophages. The results open perspectives for the discovery of new antifungal strategies.

**Keywords:** *Trichosporon*, biofilms, *Bacillus subtilis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos morfofisiológicos de <i>Trichosporon</i> spp. ....	24
Figura 2 – Septo tipo doliporo de <i>Trichosporon</i> coremiforme CBS 2482.....	25
Figura 3 – Estrutura química do biossurfactante surfactina .....	35
Figura 4 – Estrutura química do biossurfactante Iturina .....	36
Figura 5 – Estrutura química do biossurfactante fengicina .....	37
Figura 6 – Tempo de morte representativo de <i>T. asahii</i> após a exposição ao TIM96 e AMB .....	54
Figura 7 – Tempo de morte representativo de <i>T. inkin</i> após a exposição ao TIM96 e AMB .....	55
Figura 8 – Tempo de morte de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 .....	56
Figura 9 – Teor de ergosterol em cultivos planctônicos de <i>Trichosporon</i> spp. ....	56
Figura 10 – Absorbância do conteúdo extracelular dos isolados de <i>Trichosporon</i> após exposição a diferentes concentrações de TIM96 e feniletilideno, testados isoladamente .....	57
Figura 11 – Atividade citotóxica do TIM96 sobre culturas de células RAW264.7 .....	58
Figura 12 – Hidrofobicidade celular superficial relativa de <i>T. asahii</i> (n=3) e <i>T. inkin</i> (n=3) ....	59
Figura 13 – Capacidade de formação de biofilme de isolados de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> , utilizando a metodologia de quantificação de biomassa por cristal violeta .....	59
Figura 14 – Adesão de células à superfície expostas ao TIM 96 e AMB, ambas isoladamente .....	60
Figura 15 – Potencial inibitório de TIM96 e AMB, isoladamente, em suas concentrações 10XCIM, frente a cepas das espécies de <i>T. asahii</i> (n=4) e <i>T. inkin</i> (n=6), após 24 h de crescimento .....	61
Figura 16 – Potencial inibitório de AMB e TIM96, isoladamente, em suas concentrações 10XCIM, frente a cepas das espécies de <i>T. asahii</i> (n=4) e <i>T. inkin</i> (n=6), após 48 h de crescimento .....	62

Figura 17 – Sensibilidade dos biofilmes maduros ao TIM96 e AMB, separadamente .....	63
Figura 18 – Imagens de microscopia confocal de <i>T. asahii</i> CEMM 05-6-072 e <i>T. inkin</i> CEMM 05-6-074 .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos espécimes clínicos de <i>Trichosporon</i> utilizados neste estudo.....	16
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima de TIM96, anfotericina B, fluconazol e voriconazol frente a espécies de <i>Trichosporon</i> .....	17

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Equação utilizada neste estudo para se determinar o índice de hidrofobicidade da superfície celular.....	20
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-flucitosina
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF	Antifúngico
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DNAr	DNA ribossomal
FLC	Fluconazol
GXM	Glucoronoxilomanana
ITC	Itraconazol
KOH	Hidróxido de Potássio
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNC	Sistema nervoso central
UFC	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1	Infecções fúngicas .....	21
2.1.1	<i>O gênero Trichosporon: características gerais e identificação laboratorial</i> .....	22
2.1.2	<i>Infecções por Trichosporon spp.</i> .....	24
2.1.3	<i>Fatores de virulência de Trichosporon spp.</i> .....	26
2.1.4	<i>Biofilmes</i> .....	28
2.1.5	<i>Sensibilidade aos antifúngicos</i> .....	30
2.2	Biossurfactantes .....	32
3	PERGUNTAS DE PARTIDA .....	39
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS .....	39
5	OBJETIVOS .....	40
5.1	Objetivo geral .....	40
5.2	Objetivos específicos .....	40
6	MATERIAL E MÉTODO .....	41
6.1	Local de estudo .....	41
6.2	Micro-organismos utilizados .....	41
6.3	Obtenção do biossurfactante de <i>Bacillus subtilis</i> .....	42
6.4	Células planctônicas .....	43
6.4.1	<i>Atividade antifúngica</i> .....	43
6.4.2	<i>Interações farmacológicas entre TIM96 e antifúngicos clássicos pelo método checkerboard</i> .....	44
6.4.3	<i>Tempo de morte</i> .....	44
6.4.4	<i>Efeito do TIM96 sobre o teor de ergosterol de células planctônicas</i> .....	45
6.4.5	<i>Dano à membrana celular</i> .....	46
6.4.6	<i>Citotoxicidade</i> .....	47
6.4.6.1	<i>Cultura de células e avaliação da atividade citotóxica</i> .....	47
6.4.7	<i>Alteração na hidrofobicidade celular</i> .....	47
6.5	Células associadas em biofilme .....	48
6.5.1	<i>Formação do biofilme</i> .....	48

6.5.1.1	<i>Efeito do TIM96 na adesão celular</i> .....	48
6.5.1.2	<i>Efeito do TIM96 no desenvolvimento do biofilme</i> .....	49
6.5.1.3	<i>Efeito do TIM96 sobre o biofilme maduro</i> .....	49
6.5.2	<b>Métodos quantitativos para a avaliação de resultados em biofilmes</b> .....	50
6.5.2.1	<i>Atividade metabólica</i> .....	50
6.5.2.2	<i>Biomassa</i> .....	50
6.6	<b>Fisiologia dos biofilmes</b> .....	50
6.6.1	<i>Microscopia confocal</i> .....	50
7	<b>RESULTADOS</b> .....	51
7.1	<b>Células planctônicas</b> .....	51
7.1.1	<i>Sensibilidade das células planctônicas de Trichosporon spp. ao TIM96 e aos antifúngicos</i> .....	51
7.1.2	<i>Interações farmacológicas entre TIM96 e antifúngicos clássicos pelo método checkerboard</i> .....	52
7.1.3	<i>Tempo de morte</i> .....	52
7.1.4	<i>Influência do TIM96 sobre o teor de ergosterol celular</i> .....	56
7.1.5	<i>Efeito do TIM96 sobre o dano à membrana celular</i> .....	57
7.1.6	<i>Avaliação da atividade citotóxica</i> .....	58
7.1.7	<i>Alteração na hidrofobicidade celular</i> .....	58
7.2	<b>Células associadas em biofilme</b> .....	59
7.2.1	<i>Máxima formação dos biofilmes</i> .....	59
7.2.2	<i>Efeito do TIM96 sobre a adesão do biofilme</i> .....	60
7.2.3	<i>Efeito do TIM96 sobre o biofilme em formação</i> .....	60
7.2.4	<i>Efeito do TIM96 sobre o biofilme maduro</i> .....	62
7.3	<b>Fisiologia dos biofilmes</b> .....	63
7.3.1	<i>Microscopia confocal</i> .....	63
8	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
9	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>ANEXO</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

As micoses oportunistas têm se tornado um sério problema de saúde pública, sendo responsáveis pelo aumento das taxas de morbi-mortalidade dos pacientes acometidos (JAIN et al., 2010). Alguns fatores podem ser elencados como predisponentes para tal quadro infeccioso, tais como: neutropenia, transplante de órgãos, uso de esteroides, quimioterapia antineoplásica, infusões intravenosas prolongadas e tratamento com antibióticos de largo espectro (WALSH et al., 2004a). Dentre os fungos causadores desse tipo de infecção, o gênero *Trichosporon* vem ganhando cada vez mais destaque, sendo relatado como um patógeno oportunista emergente (COLOMBO et al., 2011).

O gênero *Trichosporon* compreende fungos leveduriformes basidiomicetos que são amplamente distribuídos na natureza, fazendo parte da microbiota humana permanente do trato gastrointestinal e da microbiota transitória da pele, mucosa orofaríngea e trato respiratório superior de humanos (COLOMBO et al., 2011). Esse gênero é muito bem relatado na literatura por causar infecções superficiais benignas, conhecidas como *pieira* branca, e também por causar infecções sistêmicas, sendo esse quadro decorrente do desequilíbrio imunológico no hospedeiro (SIDRIM; ROCHA, 2004; SILVESTRE et al., 2010). Infecções sistêmicas causadas por esse gênero, estão relacionadas a pacientes com doenças hematológicas malignas e, depois de *Candida* spp., são a segunda causa de infecção fúngica mais comum (GIRMENIA, et al., 2005).

Como fatores de virulência desse gênero fúngico, podemos citar a produção de melanina (CARVALHO et al., 2014), a qual está em fase de investigação, porém tudo indica que possa contribuir para a sua virulência e influenciar na resposta imune do hospedeiro de forma a interferir com a função normal fagocítica de macrófagos, bem como a resistência a antifúngicos (EISENMAN; CASADEVALL, 2012), e a produção de biofilmes, sobretudo em superfícies como a de catéteres, representando um desafio real ao profissional de saúde (CHANDRA, J; MUKHERJEE, 2015). As células, quando associadas em comunidades sésseis, apresentam um perfil diferente de uma célula de vida livre, o que determina um fenótipo de resistência aos antifúngicos (RAMAGE et al., 2012).

Biossurfactantes são compostos anfifílicos de origem biológica que tem conhecida capacidade de redução da tensão superficial do meio (BANAT et al., 2014). Essas biomoléculas apresentam características intrínsecas como agentes antimicrobianos, antifúngicos e antivirais que os levaram ao seu potencial uso na área médica. Podem ser utilizadas como revestimentos biológicos anti-adesivos para materiais médicos de inserção,

inibindo a formação de biofilmes bacterianos, causando sua dispersão em até 97%. Já existem relatos de biossurfactantes que são capazes de reduzir a formação de biofilmes de *Candida albicans*, podendo reduzir as infecções hospitalares, uso de drogas e produtos químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006; COCHIS et al., 2012; BANAT et al., 2014).

Sendo biofilme um importante fator de virulência e que o material complexo extracelular que compõe a matriz destes, representa um papel fundamental na defesa contra células fagocitárias, agindo como suporte na manutenção da integridade do biofilme, formando por fim, uma barreira que impede a difusão de substâncias tóxicas (NEGRI et al., 2012), o objetivo do nosso trabalho é analisar qual o impacto do biossurfactante TIM96, isolado de uma cepa de *Bacillus subtilis* frente a espécies de *Trichosporon*, quanto a sua forma planctônica e séssil, investigando a sua atividade sobre a superfície da célula fúngica, bem como a sua capacidade de interferir nas etapas de formação dos biofilmes de *Trichosporon*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções fúngicas

Fungos são seres eucariontes, heterotróficos, que morfologicamente podem se apresentar como leveduras ou filamentosos. Grande parte das espécies fúngicas é ubíqua no ambiente e pode interagir com plantas, animais ou seres humanos, estabelecendo com eles relação simbiótica, comensal ou patogênica (ROMANI, 2011).

Nas últimas três décadas, as infecções fúngicas têm se tornado mais frequentes, resultando em elevadas taxas de morbi-mortalidade em algumas populações de pacientes (CHAGAS-NETO et al., 2008). À medida que a população de imunossuprimidos aumenta, a incidência de doenças fúngicas também cresce. Avanços tecnológicos para o tratamento de doenças graves, transplantes de órgãos, hemodiálise, nutrição parenteral e uso dispositivos invasivos, também contribuem para a colonização e invasão da pele e mucosas por fungos potencialmente patogênicos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). A incidência de infecções fúngicas nosocomiais tem atingido valores elevados nas últimas décadas, acarretando índices de mortalidade de até 60%, acometendo com frequência pacientes internados em unidades de terapia intensiva (HOTA, 2004). Doenças de base, extremos de idade e imunossupressão contribuem para o estabelecimento de infecções nosocomiais. Adicionalmente a utilização de dispositivos invasivos, tais como as sondas vesicais e nasogástricas, acessos intravenosos e ventilação mecânica, aumentam a vulnerabilidade dos pacientes a essas infecções (MAJUMDAR; PADIGLIONE, 2012). Dados epidemiológicos mostraram que as infecções fúngicas estão relacionadas ao emprego de catéter venoso central, representando 12% dos casos de sepse e 87% das infecções hematogênicas primárias, as quais são responsáveis por até 38% dos casos de óbito (RICHARDS et al., 2000; MERMEL et al., 2001).

Por colonizarem a pele e proliferarem em diferentes partes do corpo humano, fungos do gênero *Trichosporon* vêm ganhando cada vez mais importância no cenário clínico. Algumas espécies são capazes de colonizar o sistema gastrointestinal, trato respiratório, pele e vagina. Podem causar desde infecções superficiais até profundas, sendo bem documentado causando infecções principalmente em pacientes com malignidades hematológicas e outras enfermidades relacionadas à imunossupressão do hospedeiro (COLOMBO et al., 2011).

### 2.1.1 O gênero *Trichosporon*: características gerais e identificação laboratorial

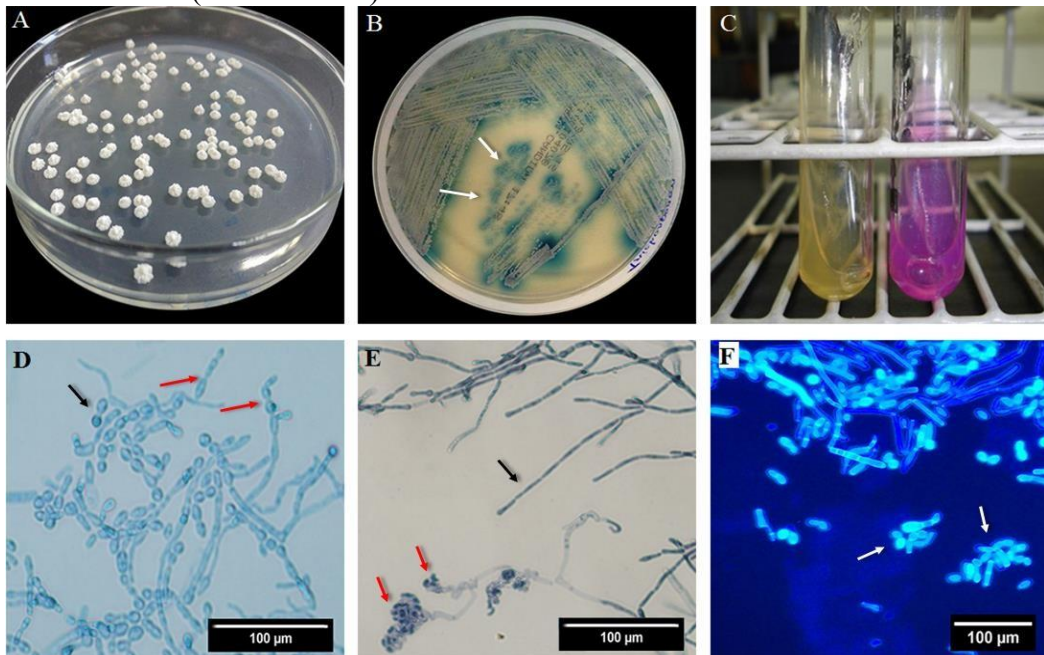
Os fungos do gênero *Trichosporon* pertencem ao filo *Basidiomycota*, subfilo *Agaricomycotina*, classe *Tremellomycetes*, ordem *Trichosporonales*, família *Trichosporonaceae* (KURTZMAN et al., 2011). Atualmente, o gênero está subdividido em 5 clados (*cutaneum*, *ovoides*, *brassicae*, *gracile* e *porosum*) que compreendem 51 espécies, sendo *T. asahii*, *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* e *T. ovoides* as espécies mais clinicamente importantes (KURTZMAN et al., 2011; MARINÉ et al., 2015). São organismos amplamente distribuídos na natureza, sobretudo em áreas tropicais e temperadas. Podem ser encontrados em substratos como solo, madeira em decomposição, rios e lagos, bem como em excrementos de diversos animais como morcegos, pombos e bovinos (SUGITA et al., 2000; COLOMBO et al., 2011). Essas leveduras fazem parte da microbiota humana permanente do trato gastrointestinal e da microbiota transitória da pele, mucosa orofaríngea e trato respiratório superior (CHAGAS-NETO; CHAVES et al., 2008; VAZQUEZ, 2010).

O gênero *Trichosporon* apresenta colônias que se apresentam em ágar sabouraud dextrose com textura glabrosa, podendo ser úmidas ou secas, com relevo cerebriforme, acompanhadas ou não de uma cobertura farinácea branca. Colônias de *Trichosporon* spp. apresentam crescimento que pode variar de 2 a 7 dias, com coloração típica predominantemente branca, pregueada e rugosa, seca ou opaca (Figura 1A). Cultivos em meio CHROMagar *Candida* (Difco®) (Figura 1B) apresentam uma coloração verde-azulada, tonalidades lilás com zona marginal da colônia não pigmentada em até 72 horas (BENTUBO, 2008). Assim como os demais basidiomicetos, os fungos do gênero *Trichosporon* possuem a enzima urease dependente de níquel, sendo, portanto, capazes de degradar ureia em amônia e carbamato (Figura 1C) (DE HOOG et al., 2000; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; COLOMBO et al., 2011).

*Trichosporon* spp. apresentam blastoconídios (Figura 1D), hifas artroconodiadas e hifas verdadeiras (Figura 1E). Seus artroconídios (Figura 1F) são geralmente abundantes (LEE et al., 1990; AHMAD et al., 2005; BENTUBO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011). Quanto à reprodução, é um fungo que se reproduz fundamentalmente de maneira assexuada (SIDRIM; ROCHA, 2004); a sua forma sexuada ainda não é conhecida (MORROW; FRASER, 2009; KURTZMAN et al., 2011).

Fisiologicamente, fungos do gênero *Trichosporon* possuem a capacidade de assimilar diversas fontes de carbono, incluindo monossacarídeos (pentoses e hexoses), dissacarídeos (celobiose, maltose, lactose, sacarose, melibiose, trealose) e polissacarídeos (amido e xilano). Algumas espécies também assimilam compostos aromáticos como única fonte de carbono, incluindo fenol, cresol, salicilatos, benzoatos e aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Esses organismos, contudo, realizam apenas metabolismo oxidativo, não sendo capazes de realizar fermentação de compostos orgânicos (Kurtzman et al., 2011).

Figura 1 – Aspectos morfofisiológicos de *Trichosporon* spp.: (A) Colônias de *T. inkin* em meio ágar batata, revelando coloração branca e aspecto cerebriforme (B) aspecto de *Trichosporon* sp. em CHROmagar Candida (Difco®), mostrando colônias de cor verde (setas em branco) (C) Prova da urease em meio Ureia de Christensen, mostrando reação positiva (cor rosa), em oposição ao controle negativo (cor amarela). (D) Pseudo-hifas (setas vermelhas) e blastoconídios (seta preta). (E) Hifa verdadeira (seta preta) e apressório (setas vermelhas). (F) Arthroconídios (setas brancas).

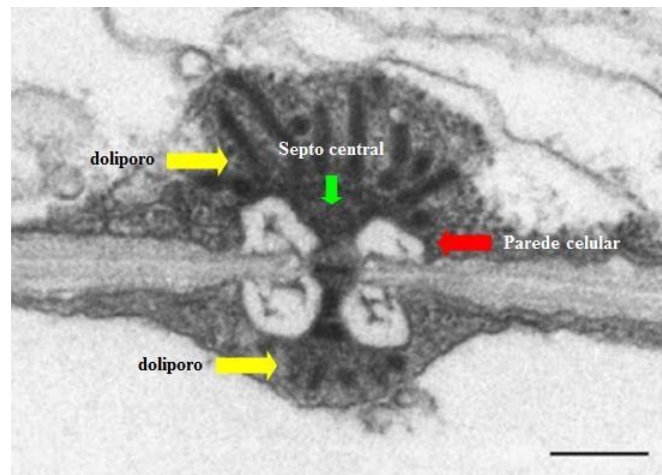


Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM/UFC (2016).

Além disso, apresentam como características a presença de carboidratos na composição da parede celular (xilose) e a relação guanina-citocina (57-60%), observando também a presença de septos doliporos (BISWAS et al., 2005; KURTZMAN et al., 2011; COLOMBO et al., 2011). Caracteristicamente, os basidiomicetos do subfiló Agaricomycotina são caracterizados por um septo tipo doliporo (Figura 2), o qual se apresenta como uma

estrutura semelhante a um capuz que recobre a porção da parede celular avolumada que circunda o septo celular central em uma estrutura tubular (hifa e/ou pseudohifa). Esses organismos possuem também glicose, manose e xilose como componentes principais de suas paredes celulares (KURTZMAN et al., 2011).

Figura 1 - Septo tipo doliporo de *Trichosporon coremiforme* CBS 2482.



Fonte: Imagem extraída de Guého et al. 1992.

### 2.1.2 Infecções por *Trichosporon spp.*

*Piedra* branca, uma tricopatia pura causada por espécies do gênero, muitas vezes se apresenta de forma assintomática e se caracteriza por uma massa muscilaginosa de coloração branca, cinza pálida ou amarelada, facilmente destacada do pelo e sem predileção por grupos raciais, faixas etárias ou sexo, podendo ocorrer sobre o couro cabeludo, sobrancelhas, pestanas, barba, axila ou sobre os pelos pubianos (GUÉHO et al., 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004; ROSHAN et al., 2009). Essa doença geralmente está associada a falta de higiene e a umidade, o que propicia o crescimento do fungo (COLOMBO et al., 2011).

Outras infecções superficiais podem estar associadas ao gênero *Trichosporon*, a exemplo da onicomicose, onde a espécie do gênero mais frequentemente isolada é *T. cutaneum*. (CHAGAS-NETO et al., 2008; COLOMBO et al., 2011; HAN et al., 2000). O primeiro relato de caso de onicomicose por *Trichosporon* sp. foi descrito por Fusaro e Miller (1984) em um paciente do sexo masculino de 47 anos, sem co-morbidades, que apresentava infecção por causada por esses fungos nas unhas do quarto e quinto dígito de uma das mãos.

Sugere-se que *Trichosporon* spp. podem também desempenhar um papel importante nas infecções invasivas, havendo relatos de caso de infecção do microrganismo em pacientes com neoplasias hematológicas (GIRMENIA et al., 2005). Infecções sistêmicas causadas por espécies desse gênero são constantemente relatadas em associação ao uso de catéteres e outros dispositivos médicos invasivos (SILVESTRE, et al., 2010; MICELI et al., 2011). Dessa forma, *Trichosporon* se comporta como fungo oportunista que apresenta vários fatores que permitem seu crescimento e estabelecimento no hospedeiro, assim como a capacidade de estabelecer a doença (COLOMBO et al., 2011; LIAO et al., 2015).

As micoses oportunistas têm demonstrado ser um problema de saúde pública e este representa um desafio para o profissional de saúde, uma vez que também cresce o número de pacientes imunocomprometidos, os quais são tratados a base de quimioterápicos (JAIN et al., 2010). Fatores predisponentes podem ser apontados para causar tal quadro infeccioso, tais como: neutropenia, transplantes de órgãos, quimioterapia antineoplásica, infusões intravenosas prolongadas e tratamento com antibióticos de largo espectro. Embora espécies de *Candida* sejam as mais relacionadas as infecções fúngicas nosocomiais (WALSH et al., 2004a), o gênero *Trichosporon* vem ganhando mais destaque dentre os fungos chamados oportunistas emergentes (PFALLER; DIEKEMA, 2004; COLOMBO et al., 2011).

*Trichosporon* está sendo relatado como a segunda causa mais comum de infecções fúngicas invasivas depois daquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* em pacientes com malignidades hematológicas e, ocasionalmente (WOLF et al., 2001; GIRMENIA et al., 2005;), sendo que, em relação as infecções causadas por *Candida* spp., sugere-se que espécies do gênero *Trichosporon* estão associados a maiores taxas de reisolamento na corrente sanguínea e consequentemente a um pior prognóstico (GIRMENIA et al., 2005).

As tricosporonoses invasivas têm sido cada vez mais relatadas nas últimas décadas. A tricosporonose pode ser didaticamente dividida em: localizada, quando é caracterizada por infecções restritas a um único órgão, ou sistema. Esse tipo de infecção acomete mais comumente as válvulas cardíacas, peritônio, feridas cirúrgicas e sistema nervoso central (SNC) (COX; PERFECT, 1999). Já a forma disseminada geralmente ocorre em situações de neutropenia, sendo caracterizada por um estado febril inespecífico, o qual não cede a terapia com antibióticos ou antifúngicos. A infecção pode progredir rapidamente, podendo culminar em uma falência múltipla dos órgãos. Pulmões e rins são mais frequentemente envolvidos. Pacientes com acometimento pulmonar, frequentemente apresentam dispneia e tosse com escarro escasso com presença de sangue. Hematúria e proteinúria caracterizam as manifestações clínicas de uma possível falência renal (COX;

PERFECT, 1999). O tratamento à base de antibióticos de largo espectro e a ruptura de barreiras anatômicas são a razão pela qual há o aumento da colonização da mucosa e infecção invasiva por leveduras desse gênero, com altas taxas de mortalidades que podem variar de 60% a 80% (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008).

Vale ressaltar, que as infecções sistêmicas causadas por espécies de *Trichosporon* comumente se associam ao uso de catéteres intravenosos (SUZUKI et al., 2010; DAVIES; THORNTON, 2014; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014;). Além dos catéteres servirem como uma porta de entrada para os microrganismos, as colonizações da pele e do trato gastrointestinal, atuam como um reservatório desses patógenos (WALSH et al., 2004b). Dentre as espécies de *Trichosporon*, a mais relacionada a infecções invasivas é *T. asahii* (LIAO et al., 2015; RUAN; CHIEN; HSUEH, 2009), também considerado agente comum do meio ambiente (SUGITA et al., 2000b), seguido por *T. mucoides* e *T. inkin* (FLEMING; WALSH; ANAÏSSIE, 2002; MADARIAGA; TENORIO; PROIA, 2003), esta última relacionada a casos de endocardite, peritonite e transplante de medula óssea (CASERO et al., 1996; MORETTI-BRANCHINI et al., 2001; MADARIAGA et al., 2003; RAMOS et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008; SILVESTRE et al., 2010).

### 2.1.3 Fatores de virulência de *Trichosporon* spp.

A virulência pode ser expressa por meio de inúmeros mecanismos com o objetivo comum de promoção da adesão, penetração e multiplicação de um parasita no tecido alvo de seu hospedeiro (FORATTINI, 2001). A capacidade de invasão tecidual de *Trichosporon* spp. depende da expressão de inúmeros fatores de virulência, tais como: glucuronoxilomananas na parede celular; exoenzimas, como fosfolipases e proteases; formação de hifas e pseudo-hifas; melanina e; biofilmes (MARINÉ et al., 2015). Esses componentes potencializam a capacidade que o microrganismo possui de colonizar, invadir seu hospedeiro, evitar o sistema imunológico e contribuir para o aumento da morbi-mortalidade (CHOW et al., 2012).

Glucuronoxilomanana (GXM), polissacarídeo associado a parede celular, é um antígeno que tem sido associado à virulência de fungos do gênero *Cryptococcus*. Também produzido por *Trichosporon* spp. (FONSECA et al., 2009), sabe-se que é um importante componente da superfície celular, sendo expresso em grandes quantidades em cepas oriundas de infecções profundas (LYMAN et al., 1995). Manose (60%), xilose (24%) e glicose (8%), são os componentes mais comumente isolados de *T. asahii*. Em relação à GXM produzida por *C. neoformans*, a diferença está no terceiro componente que, ao invés de ser glicose,

encontramos como o terceiro mais comumente isolado o ácido glucurônico (COLOMBO et al., 2011). Isolados de *Trichosporon* spp. de infecções profundas tem demonstrado altas concentrações desse polissacarídeo e apresentando a mesma propriedade imunomodulatória apresentada na criptococose, inibindo a fagocitose por monócitos (LYMAN et al., 1995). Karashima et al. (2002) apresentaram resultados que confirmam essa afirmação. Após sucessivas passagens de *T. asahii* em camundongos, evidenciou-se claramente o incremento na produção desse antígeno.

A transição morfológica, ou seja, a capacidade que uma levedura tem de mudar morfológicamente de blastoconídios para pseudo-hifas e/ou hifas, é estimulada por condições ambientais e é um dos fatores mais importantes na virulência (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013). Em *Candida albicans*, a transição de levedura para hifas está relacionada com a patogenicidade do fungo. A forma filamentosa possui uma estrutura que permite uma penetração no tecido do hospedeiro mais fácil do que quando este se apresenta em sua forma de levedura (GOW et al., 2002; YANG, 2003). Em experimentos realizados com espécies de *Candida* spp. em cobaias, mostrou-se que as leveduras que eram capazes de produzir hifas apresentavam uma maior capacidade de invasão ao tecido. Já as que por mutação perderam a capacidade de produção de hifas, diminuíram o seu potencial de penetração no tecido hospedeiro. (FELK et al., 2002).

Uma outra característica importante na virulência presente em muitos fungos patogênicos é a habilidade de produção de enzimas capazes de degradar vários componentes de tecidos do hospedeiro (SILVESTRE et al., 2010). A expressão de enzimas extracelulares como as fosfolipases, lipases, esterases, dextrorribonucleases (DNases) e proteases, está associada com a virulência de isolados causadores de micoses importantes (GÁCSEK et al., 2007), permitindo a degradação de vários componentes teciduais do hospedeiro, auxiliando na invasão e obtenção de nutrientes (COLOMBO et al., 2011).

Fosfolipases possuem um papel importante na invasão fúngica, permitindo a degradação de fosfolipídeos da membrana. Lipases e esterases, por sua vez, são enzimas responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos (SCHALLER et al., 2005), sendo esterases relatada em quase todos os isolados clínicos analisados, sugerindo um papel na virulência de espécies de *Trichosporon*. (MONTROYA et al., 2015).

Desoxirribonucleases (DNases) tem sido relatada a sua produção em isolados clínicos de *Trichosporon* (BENTUBO et al., 2014; MONTROYA et al., 2015). Em *T. asahii*, a produção de  $\beta$ -N-Acetilhexosaminidases, responsável pela catalização da hidrólise de N-acetil-hexanamina, pode estar envolvida com a patogenicidade fúngica por meio da

degradação de oligossacarídeos do hospedeiro, a exemplo da N-acetil-glicosamina (ICHIKAWA et al., 2004).

Proteases, por sua vez, apresentam importante papel na superação de barreiras físicas e imunológicas do hospedeiro, uma vez que, a atividade proteolítica de *Trichosporon* spp. pode estar relacionada a uma resposta adaptativa ao ambiente em que estejam inseridos, a exemplo da pele (MARINÉ et al., 2015).

A melanina é um polímero que possui um alto peso molecular, amplamente funcional e bem distribuído na natureza. É produzida por meio de reações poliméricas oxidativas a partir de compostos fenólicos, que ao final, podem apresentar uma coloração que pode variar do marrom escuro ao preto (HAMILTON; GOMEZ, 2002). Esse pigmento único e biologicamente importante pode ser produzido por alguns fungos contribuindo para a sua virulência e influenciando na resposta imune do hospedeiro de forma a interferir com a função normal fagocítica de macrófagos, bem com a resistência a antifúngicos (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; RAPARIA et al., 2010). Diversos patógenos fúngicos possuem a capacidade de produzir melanina: *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 2000), *Exophiala dermatitidis* (PAOLO et al., 2006), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002), *Blastomyces dermatitidis* (NOSANCHUK et al., 2004) e *Paracoccidioides brasiliensis* (GÓMEZ et al., 2001). Recentemente, foi relatado que, na presença do precursor L-DOPA, ocorre produção de melanina por cepas de *Trichosporon*. Esse achado pode estar intimamente relacionado à virulência de *Trichosporon* spp., embora sejam necessários mais estudos para o entendimento da função da melanina na patogenia do fungo (CARVALHO et al., 2014).

#### **2.1.4 Biofilme**

Biofilme é considerado um fator de virulência de grande importância para os microrganismos, uma vez que essa organização celular oferece vantagens como proteção contra o ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012).

Biofilmes são comunidades microbianas sésseis, unidas entre si, de estrutura tridimensional, aderidas a uma superfície que pode ser biótica ou abiótica, recobertos por uma matriz extracelular polimérica (RAMAGE et al., 2012). O material complexo extracelular que compõe a matriz dos biofilmes tem um papel fundamental na defesa contra células fagocitárias, age como suporte na manutenção da integridade do biofilme, formando por fim,

uma barreira que impede a difusão de substâncias tóxicas (NEGRI et al., 2012). Não obstante, células sésseis de biofilmes apresentam uma resistência aumentada a agentes antimicrobianos e células de defesa do hospedeiro (RAMAGE et al., 2006), sendo relatados por possuírem uma resistência de até 1000 vezes maior que as células planctônicas (RAMAGE et al., 2012). De maneira geral, o aumento da densidade celular, o estado fisiológico em que as células se encontram, a presença de células persistentes, a matriz exopolimérica, o aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bombas de efluxo, são mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência aos antifúngicos em biofilmes (RAMAGE et al., 2012).

Quanto a matriz extracelular dos biofilmes, esta pode corresponder até cerca de 85% do seu volume total, desempenhando papel fundamental na proteção das células fúngicas contra a resposta imunológica, sendo considerada um dos principais mecanismos de resistência aos antifúngicos. Possuindo constituição química complexa, pode funcionar como uma barreira físico-química, que reduz a penetração do antifúngico (RAMAGE et al., 2012).

Infecções causadas por fungos quando associados em biofilmes, a exemplo de *Candida*, estão intimamente relacionadas ao uso de catéteres e são uma das principais causas para as altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (HANSAN et al., 2009). Esses dispositivos médicos podem se tornar colonizáveis por uma série de micorganismos fúngicos, proporcionando um nicho ideal para a formação de biofilmes (CHANDRA, J; MUKHERJEE, 2015; NETT; ANDES, 2006). Infecções desse tipo são difíceis de ser tratadas e podem requerer terapia antifúngica de longo prazo, bem como a remoção física do cateter para o controle da infecção (RAMAGE et al., 2012). Em biofilmes de *Candida spp.*, por exemplo, isso demonstra a complicação no quadro clínico do paciente, uma vez que durante o desenvolvimento dos biofilmes, blastoconídios são dispersos. Essa dispersão celular apresenta células que são capazes de formar biofilmes e com uma alta capacidade de adesão celular, apresentando também, maior virulência em modelo murino. Essas células podem ser liberadas já nos estágios iniciais de formação do biofilme, sendo o número máximo de células liberadas durante a fase intermediária (UPPULURI et al., 2010).

O progresso da tricosporonose, uma doença sistêmica grave que acomete pacientes imunocomprometidos, pode estar relacionado à formação de biofilmes sobre catéteres venosos, vesicais ou relacionados a catéteres peritoneais, uma vez que promove a fuga às drogas antifúngicas e à resposta imune do hospedeiro (COLOMBO et al., 2011; DAVIES; THORNTON, 2014). *T. asahii*, relatado como principal causador de tricosporonose disseminada ou profunda, também foi relatado como causador de infecção em pacientes

neutropênicos, tendo como fator predisponente, o uso de dispositivos invasivos como catéteres intravenosos ou urinários (COLOMBO et al., 2011). *Trichosporon* spp., assim como muitas outras espécies fúngicas, podem produzir biofilmes por meio de eventos que vão desde a adesão até a maturação e que assim como *Candida* spp., podem aderir a superfícies de poliestireno após uma incubação de 30 min (COLOMBO et al., 2011; DI BONAVENTURA et al., 2006), sendo que a formação máxima do biofilme ocorre após as 6 horas de adesão e posterior maturação após 48 horas (CORDEIRO et al., 2015). A capacidade que espécies desse gênero possui de formar biofilmes pode ser resultado da hidrofobicidade da superfície celular intrínseca (DI BONAVENTURA et al., 2006; BUJDÁKOVÁ et al., 2013).

### **2.1.5 Sensibilidade aos antifúngicos**

Infecções fúngicas invasivas necessitam de longos períodos de terapia a base de antifúngicos. Em muitos casos, há relatos de resistência por alguns fungos a esses medicamentos. Por essa razão existe a necessidade de realização de testes de sensibilidade *in vitro* para a avaliação do comportamento desses microrganismos frente às drogas disponíveis no mercado (PFALLER, 2012; POSTERARO et al., 2014).

Devido a importância de realização do teste de sensibilidade, para se guiar as decisões clínicas com o objetivo de promoção de uma terapia adequada contra patógenos fúngicos obtendo-se os melhores resultados para o paciente, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicou documentos com padronização do testes de sensibilidade *in vitro* para fungos, onde aborda parâmetros como: pH do meio, inóculo a ser utilizado, condições de incubação, concentrações dos fármacos a serem utilizados e o critério adotado para a leitura (CLSI, 2008).

O documento M27-A3 do CLSI, descreve como devem ser realizados os testes de sensibilidade aos antifúngicos para leveduras, não trata de forma específica o gênero *Trichosporon*. Mesmo assim, a comunidade científica utiliza de forma adaptada o documento do CLSI M27-A3, que trata a técnica de microdiluição em caldo, disponível desde 2008, padronizado para *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (CLSI, 2008).

Antifúngicos utilizados na terapêutica contemporânea se dividem de acordo com seu mecanismo de ação na célula fúngica: inibidores da síntese de ergosterol (azólicos, derivados morfolínicos e alilaminas), que embora possuam a mesma finalidade fisiológica, diferentes enzimas-alvo são inibidas; os que atuam sobre a permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol presente (derivados poliênicos); os que inibem a síntese de

parede celular (equinocandinas, nicamicina); os que inibem a síntese de ácidos nucleicos (5-flucitosina) e inibição da síntese dos microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012). Dentre eles, a anfotericina B e os derivados azólicos têm sido as drogas mais usadas no tratamento das tricosporonoses invasivas.

O uso clínico dos azólicos iniciou-se em meados da década de 70, o que causou um grande impacto na terapia antifúngica, não só pelo largo espectro de ação, mas pela facilidade da administração via oral, com cetoconazol, um imidazólico. Na década de 90 juntaram-se aos imidazólicos, os triazólicos fluconazol e itraconazol (ITZ), com melhor biodisponibilidade e atividade antifúngica mais intensa. Já na década seguinte, em 2002, voriconazol (VCZ) foi liberado para uso clínico, esse triazólico sintético da segunda geração, combina ampla espectro de ação com melhor biodisponibilidade (LARRU; ZAOUTIS 2013). Esses antifúngicos inibem a síntese do ergosterol, um importante esterol presente na membrana celular fúngica, atuando diretamente contra a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, do citocromo P450 na via da biossíntese do ergosterol, acarretando a síntese de esteróis tóxicos para a célula fúngica (KATHIRAVAN et al., 2012). Esses são os antifúngicos mais usados na prática clínica de forma geral e, consequentemente, os mais estudados pela comunidade científica (VANDEPUTTE et al., 2012).

Na década de 50 foi disponibilizado para uso anfotericina B, a primeira droga antifúngica aprovada pela *U. S. Food and Drug Administration* – FDA, a qual o espectro e eficácia a colocaram na posição ainda mantida, de droga de referência no controle de infecções disseminadas (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Derivados poliênicos como a anfotericina B (AMB) atuam diretamente sobre a membrana celular do fungo, ligando-se ao ergosterol da membrana, aumentando assim a sua permeabilidade (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Esse aumento na permeabilidade da membrana gera grande perda de eletrólitos essenciais para a manutenção da célula fúngica, como potássio e magnésio, determinando a lise celular e morte fúngica, agindo como fungicida (ELLIS, 2002). Embora AMB seja a primeira droga de escolha em muitos casos de fungemia, Girmenia et al. (2005) relataram resultados de 55 pacientes com doenças hematológicas que haviam sido acometidos por tricosporonose disseminada que foram tratados com essa droga, com resposta clínica de apenas 13/55 (24%) dos pacientes avaliados.

Kalkanci et al. (2010) realizaram um estudo onde foram examinados 107 isolados clínicos de *Trichosporon*, onde observou-se baixa sensibilidade a AMB, 5-FC e fluconazol (FLC). Foi relatado também, que (VCZ) apresentou os menores valores de CIM, sendo, portanto, o composto mais eficiente. Mekha et al., (2010), estudaram 101 isolados de *T. asahii*

oriundos de pacientes tailandeses acometidos por tricosporonose nos períodos entre 1997 e 2007 e relataram baixa sensibilidade a AMB, 5-FC, FLU. Para esses isolados, a droga que se mostrou mais eficaz foi VCZ. Em outro estudo, chegou-se à conclusão que VCZ, ITC e FLU demonstraram uma maior eficiência em relação a AMB e que sozinha, AMB não é indicada para o tratamento de tricosporonose (PAPHITOU et al., 2002). LI et al. (2005), em trabalho conduzido com isolados clínicos obtidos a partir de uma coleção de culturas fúngicas da Universidade de Pequim, analisaram CIM relativamente altos de AMB, que variaram de 1 - 16µg/mL para todos os isolados. Esses resultados sugerem que o tratamento de tricosporonose com AMB como única droga não é recomendado.

Em estudo conduzido por García-Martos et al. (2001), foi demonstrado que a eficiência de AMB frente a *Trichosporon* é espécie-dependente. Em um estudo conduzido por Hazirolan et al. (2013), 90 isolados de *T. asahii* foram utilizados para se comparar e determinar os valores de CIM e concentração fúngica mínima (CFM) de cinco triazóis: FLC, ITC, posaconazol, VCZ e isoconazol. A análise dos resultados de uma forma geral mostrou que VCZ é o triazol mais ativo contra essa espécie fúngica. Dessa forma, segundo uma revisão feita por Júnior e Hennequin (2016), a terapia de primeira escolha deve contar com azólicos, particularmente VCZ, pois este exibe melhores atividades *in vitro* contra espécies de *Trichosporon*, e significativamente leva a um melhor resultado em pacientes com homeopatias subjacentes.

Diferenças na sensibilidade aos antifúngicos são encontradas quando se analisa a concentração inibitória mínima (CIM) por local de isolamento do fungo. Cepas isoladas de sítios anatômicos profundos tendem a apresentar CIM mais elevado que isolados superficiais (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Ademais, altos valores de CIM de cepas de *T. asahii* a AMB, FLC, ITZ e 5-FC têm sido reportadas (MAKIMURA et al., 2004; PAPHITOU et al., 2002), justificando, assim, a busca por novos agentes com potencial antifúngico.

## 2.2 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos anfifílicos de origem biológica que em sua estrutura contém uma região hidrofílica (polar ou não) e uma região hidrofóbica (lipídio ou ácido graxo), que tem conhecida capacidade de redução da tensão superficial, e promovem atividade sobre a interface (BANAT et al., 2014; SATPUTE et al., 2010).

Essas moléculas apresentam grandes vantagens no que diz respeito a sua

aplicabilidade, pois por serem de origem biológica, exibem a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis, especialmente quando se trata de custos de produção (DESAI; BANAT, 1997; KOSARIC, 1992).

Os surfactantes de origem biológica vêm ganhando cada vez mais espaço nas áreas industriais como a petrolífera, alimentícia, química e farmacêutica, uma vez que, em relação aos surfactantes de uso químico, apresentam biodegradabilidade, produção em substratos renováveis e baixa toxicidade (DESAI; BANAT, 1997; RODRIGUES et al., 2006). Por sua baixa toxicidade, torna-se possível seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, trazendo sobre si, grande atenção das indústrias farmacêuticas e alimentícias (FLASZ et al., 1998).

Tais compostos ainda apresentam a capacidade de atuar em condições peculiares de temperatura, pH e concentração de sal (COOPER et al., 1981; DESAI; BANAT, 1997). Estudos conduzidos por França et al., (2015) mostraram que um biotensioativo produzido por uma cepa de *Bacillus subtilis* apresentou eficiência mesmo em condições extremas de temperatura, salinidade e pH, removendo hidrocarbonetos e metais pesados a partir de sistemas contaminados, sendo, portanto, ideal para biorremediação. Esses compostos apresentam biodegradabilidade em água e solo, o que os tornam adequados para aplicações em biorremediações e tratamento de resíduos (MULLIGAN et al., 2001).

Características intrínsecas como agentes antimicrobianos, antifúngicos e antivirais os levaram ao seu potencial uso na área médica. Essas biomoléculas além de todas essas características, podem ser utilizadas como revestimentos biológicos anti-adesivos para materiais médicos de inserção, que podem reduzir as infecções hospitalares, uso de drogas e produtos químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006).

Valraeds-Martine et al., (1995), verificaram a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus*, sugerindo assim, o desenvolvimento de agentes com potenciais anti-adesivos para o uso de catéteres, visando diminuir a formação de biofilmes. Cochis et al., (2012), demonstraram sua ação sobre biofilmes de *Candida albicans*, havendo inibição do biofilme formado sobre materiais de resina e silício. Uma possível explicação para tal fenômeno é a alteração da condição física e química do ambiente onde os biofilmes são formados. Por apresentar uma característica anfifílica, os biossurfactantes tendem a se acumular tanto na superfície quanto na interface meio-dispositivo, reduzindo assim a tensão superficial e o poder de repulsão. Dessa forma, os biossurfactantes podem interagir diretamente na inibição do processo de adesão fúngica ao substrato, o qual está intimamente relacionado com a hidrofobicidade celular (DESAI;

BANAT 1997; NITSCHKE et al. 2003; COCHIS et al. 2012).

Podem também apresentar alto e baixo peso molecular, significando basicamente que, os de alto peso molecular apresentam maior eficiência em estabilizar emulsões de óleo/água. Já os de baixo peso molecular, apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial dos meios líquidos (ROSENBERG; RON, 1999).

Os surfactantes sintéticos têm como base os seus grupamentos polares, já os biossurfactantes, classificam-se com base na natureza química do composto, sendo as maiores classes de biossurfactantes classificadas da seguinte forma: (1) glicolípideos, (2) lipopolissacarídeos, (3) lipopeptídeos e lipoproteínas, (4) fosfolípideos, ácidos graxos e lipídeos neutros (DESAI; IBRAHIM, 1997; RODRIGUES et al., 2006; BANAT et al., 2014).

Glicolípideos são geralmente carboidratos que se apresentam combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos alifáticos hidroxilados. Alguns exemplos de glicolípideos são os trealolípideos, soforolípideos e os raminolípideos (MESQUITA 2004; BANAT et al., 2014).

Lipopolissacarídeos são compostos de alto peso molecular, geralmente associados à produção de emulsão. Um exemplo é o emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, com alto peso molecular e solúvel em água (MESQUITA 2004).

Lipopeptídeos são eficazes na redução da tensão superficial e interfacial. Surfactina, produzida por *B. subtilis* é considerado um dos biossurfactantes mais poderosos já relatado (BANAT et al., 2014).

Fosfolípideos embora sejam presentes em todos os microrganismos, existem poucos relatos de exemplos de sua produção extracelular. Um exemplo seria o biossurfactante produzido por *Corynebacterium lepus* (BOGNOLO, 1999).

Ácidos graxos e lipídeos neutros são proteínas hidrofóbicas, e exemplos destes, são o ácido ustilágico e os ácidos corinomicólicos (MESQUITA 2004).

Um dos mais poderosos biossurfactantes isolados de cepas de *B. subtilis* é a surfactina (Figura 3), que consiste de um peptídeo heptamero cíclico, ligado a uma cadeia longa ácida beta-hidroxí de 13 a 15 carbonos, sendo relatado como inibidor do crescimento de biofilmes de espécies bacterianas em placas de microtitulações e catéteres uretrais (BANAT et al., 2014), e capaz de reduzir a tensão superficial a baixas concentrações (DESAI; BANAT, 1997). Esse biossurfactante já foi relatado como responsável por reduzir a biomassa de biofilme de *Legionella pneumophila* (LOISEAU et al., 2015). Surfactina possui a habilidade de desestabilizar as funções das membranas biológicas, conduzindo a um aumento da permeabilidade (BERNAT et al., 2016). Sendo esta, seu provável sítio de ação, uma vez que

surfactina apresenta uma natureza anfifílica (MEENA; KANWAR, 2015).

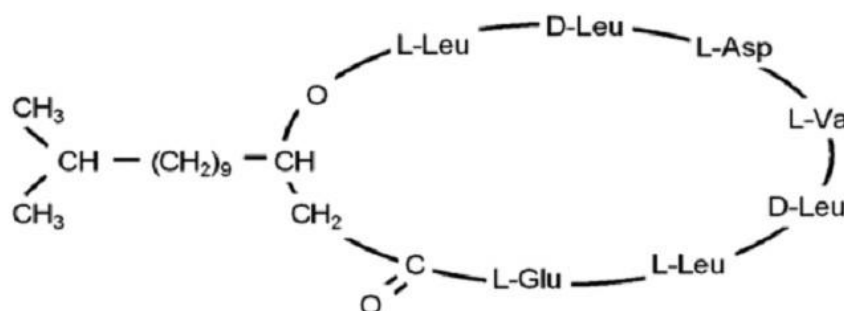


Figura 2 - Estrutura química do biossurfactante surfactina. Imagem extraída de Banat et al., 2014.

Iturina A (Figura 4), é um lipopeptídeo produzido por diversas linhagens de *B. subtilis* e que possui uma grande ação antimicrobiana. São classificados como lipopeptídios macrolídeos, ácidos, cíclicos, contendo  $\beta$ -amino ácidos graxos, geralmente com uma cadeia carbônica de C<sub>11</sub> a C<sub>17</sub>, sendo mais comum o ácido 12-metil tri ou tetradecanoico, ligada por ponte amida a um resíduo de aminoácido no anel lactona (INÉS; DHOUHA, 2015). Iturina A, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Uma hipótese é que houve um desequilíbrio osmótico provocado por uma alteração da permeabilidade celular (THIMON et al., 1995). Vale ressaltar que esse biossurfactante também é relatado como um metabólito termoestável, resistente a proteases e solúvel em metanol (BERNAL et al., 2002). Além de desorganizar a membrana plasmática por meio de formações de pequenas vesículas e pela agregação de partículas intramembranares, degradando os fosfolípídeos liberando assim eletrólitos e produtos de alto peso molecular, também aumenta a condutância elétrica. Esse aumento estimula a discussão da capacidade de formação de poros membranares pelos lipopeptídios e de sua ação frente a microrganismos patogênicos (CAMEOTRA; MAKAR, 2004).

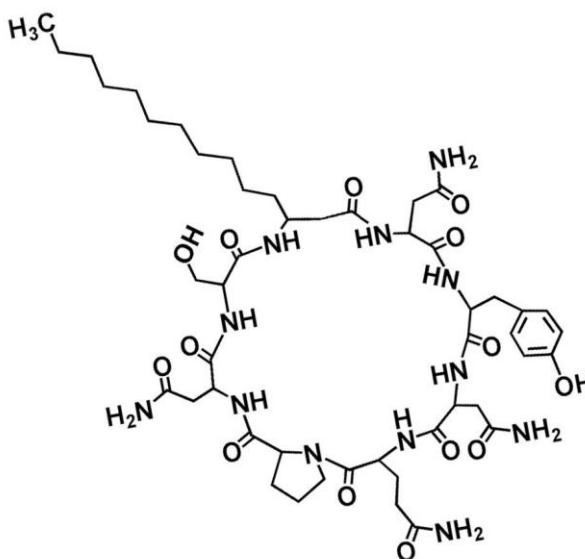


Figura 3 - Estrutura química do biossurfactante Iturina. Imagem extraída de Gong et al., 2015.

Fengicinas (Figura 5) são biossurfactantes lipopeptídicos cíclicos que contém de 8 a 10 aminoácidos ligados a um ácido graxo de *B. subtilis* ou *B. licheniformis*. Por serem lipopeptídios, possuem a característica intrínseca relatada de inibir e dispersar biofilmes (DEXTER; MIDDELBERG, 2008; BANAT et al., 2014). Fengicina exibem forte atividade antifúngica, inibindo o crescimento de uma série de agentes patogênicos, em especial os fungos filamentosos (ONGENA; JACQUES, 2008), sendo seu mecanismo de ação relatado com a capacidade de interagir causando distúrbios na integridade da membrana citoplasmática, causando o aumento da permeabilidade (BERNAT et al., 2016). São relatados como fortes inibidores de biofilmes, causando dispersão de 90% do biofilme de *Staphylococcus aureus* e até 97% do biofilme de *Escherichia coli* (BANAT et al., 2014).

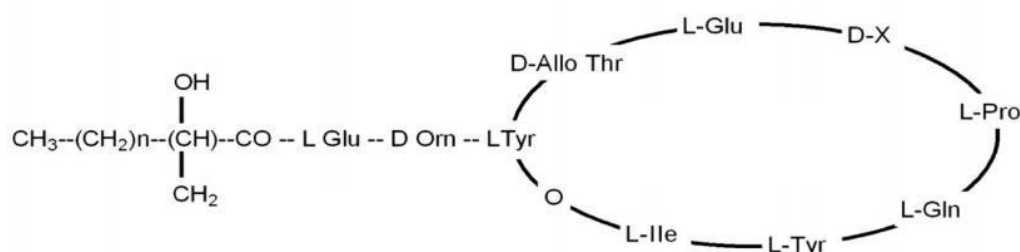


Figura 4 - Estrutura química do biossurfactante fengicina. Imagem extraída de Banat et al., 2014.

*B. subtilis* é uma rizobactéria Gram-positiva, esporulante e produtora de diversos metabólitos secundários (MCKENNEY; EICHENBERGER, 2012; STEIN, 2005). É uma espécie bacteriana amplamente adaptada, sendo capazes de crescer nos mais diversos ambientes, que incluem solo, raízes das plantas e o trato gastrointestinal de animais (EARL et al., 2010). Essa espécie bacteriana já é muito bem relatada como produtora de lipopeptídios, o que a torna interessante para o estudo na área médica (DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al., 2014;).

O gênero *Bacillus* degrada hidrocarbonetos e produz assim lipopeptídeos que são secretados para o meio onde se reúnem para formar micelas, que atuam para solubilizar o substrato. Esses biossurfactantes são excelentes espumantes e no geral muito ativos no nível de interface líquido-líquido, devido as baixas tensões interfaciais de 0,01 mN/m, que são capazes de gerar. Esses lipopeptídeos podem modular a hidrofobicidade bacteriana, por conta da capacidade que possui de adsorção na superfície celular expondo de forma alternada suas extremidades hidrófila e hidrofóbica, o que altera as propriedades da superfície de acordo com as necessidades específicas (AHIMOU et al., 2000; PERFUMO et al., 2010).

Eventos como a produção de biofilmes podem estar intimamente relacionados com a resistência aos antifúngicos clássicos de uso clínico por isolados de *Trichosporon*, como também podem desempenhar um papel crucial na patogenia desse fungo. Sabe-se que biossurfactantes possuem um excelente desempenho como antifúngicos exibindo a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis, com baixa toxicidade. Estratégias que contemplem os biossurfactantes como controle na formação de biofilmes por esses

fungos, sobretudo em ambientes hospitalares, são de grande valia. Visto a habilidade que os biossurfactantes tem de inibir a formação dos biofilmes de diversos microrganismos, é de grande interesse analisar o impacto desses sobre células de vida livre de *Trichosporon* spp., bem como sobre a formação, desenvolvimento e a maturação de biofilmes de isolados clínicos de *Trichosporon*.

### 3 PERGUNTAS DE PARTIDA

- O biossurfactante de *B. subtilis* é capaz de inibir o crescimento de cultivos planctônicos de *Trichosporon* spp.?
- Quais os mecanismos de ação associados à atividade antifúngica do biossurfactante de *B. subtilis* frente a espécies de *Trichosporon*?
- O biossurfactante de *B. subtilis* apresenta potencial citotóxico?
- O biossurfactante de *B. subtilis* é capaz de inibir a adesão dos biofilmes de *Trichosporon* spp.?
- O biossurfactante de *B. subtilis* é capaz de interferir no desenvolvimento e maturação dos biofilmes de *Trichosporon* spp.?

### 4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- O biossurfactante de *B. subtilis* inibe o crescimento de cultivos planctônicos de *Trichosporon* spp.
- O biossurfactante de *B. subtilis* age no envoltório celular fúngico, alterando a hidrofobicidade, o conteúdo do ergosterol e/ou provocando poros na membrana plasmática de espécies de *Trichosporon*.
- O biossurfactante de *B. subtilis* não apresenta potencial citotóxico.
- O biossurfactante de *B. subtilis* inibe a adesão dos biofilmes de espécies de *Trichosporon*.
- O biossurfactante de *B. subtilis* interfere no desenvolvimento e na maturação dos biofilmes de espécies de *Trichosporon*.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

➤ Investigar o efeito morfofisiológico do biossurfactante TIM96 frente a células planctônicas, e sésseis de espécimes clínicos de *Trichosporon asahii* e *T. inkin*.

### 5.2 Objetivos específicos

➤ Investigar a atividade inibitória do TIM96 em cultivos planctônicos de *Trichosporon* spp.

➤ Avaliar o efeito do TIM96 sobre a hidrofobicidade celular em cultivos planctônicos de *Trichosporon* spp.

➤ Determinar o potencial antifúngico do TIM96 frente cultivos planctônicos de *Trichosporon* spp.

➤ Avaliar a atividade inibitória do TIM96 na adesão, formação e maturação dos biofilmes de *Trichosporon* spp.

➤ Avaliar a atividade citotóxica do TIM96 frente a células de macrófagos murinos.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Local de estudo

O cultivo de *Bacillus subtilis* e a extração de biossurfactantes foram realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Maria Maciel Melo (Departamento de Biologia – UFC). Os experimentos envolvendo cultivos fúngicos foram conduzidos no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina (UFC). Análises de ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas na Central Analítica (UFC).

### 6.2 Micro-organismos utilizados

A cepa bacteriana foi isolada pelo LEMBIOTECH, de sedimentos do manguezal do rio Timonha (Barroquinha, Ceará), utilizando uma estratégia de enriquecimento para bactérias produtoras de esporos (Lima, 2013). A estirpe bacteriana foi identificada como *Bacillus subtilis*, por meio da análise da sequência do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico (rRNA 16S) (LANE et al., 1985), obtida através do sequenciamento do fragmento produzido, utilizando os iniciadores universais 27F e 1525R (MARCHESI et al., 1998). A sequência encontra-se depositada no GenBank, com o número de acesso KU556326. Foram utilizadas cepas clínicas de *Trichosporon inkin* (n=7) e *T. asahii* (n=3). A identificação de cada isolado foi realizada por testes fisiológicos, como assimilação de carboidratos, crescimento a 37°C e hidrólise de ureia, além do método de microcultivo em ágar malte (HIMEDIA, Brasil), segundo De Hoog et al. (2000).

Além disso, a identificação das cepas foi confirmada por sequenciamento da região espaçadora intergênica 1 (IGS1), da região do DNA ribossomal (DNAr), utilizando os *primers* 26SF (5'-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3') e 5SR (5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3') (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). O sequenciamento foi realizado no Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, utilizando um sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA).

Detalhes sobre a origem de cada isolado, bem como o número de depósito na Micoteca do CEMM, estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Identificação dos espécimes clínicos de *Trichosporon* spp. utilizados neste estudo.

Espécie	Identificação	Fonte	Número de Acesso GenBank*
<i>Trichosporon</i>	CEMM 05-6-072	Urina	JX124945
<i>Trichosporon</i>	CEMM 05-6-073	Catéter	JX124961
<i>Trichosporon asahii</i> (var. <i>asahii</i> )**	CEMM 03-1-072	Lesão de pele	ALBS01000003.1
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 05-6-057	Cabelo com piedra branca	99% de similaridade com HM046988.1
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 03-1-073	Unha	***
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 05-6-074	Urina	JX124953
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 05-6-075	Área perigenital	JX124985
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 01-1-143	Superficial	JX125002.1
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 01-1-144	Superficial	JX124989.1
<i>Trichosporon inkin</i>	CEMM 01-1-145	Urina	JX124958.1

Fonte: elaborada pelo autor.

\* Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

\*\* Cepa de referência CBS 2479 (Centraalbureau voor Schimmelcultures)

Antes de cada etapa experimental apresentada a seguir, as cepas foram repicadas em ágar batata e incubadas a 35°C por 48h. A análise micromorfológica das colônias puras foi realizada em preparação tipo lâmina-lamínula com lactofenol azul algodão.

### 6.3 Obtenção do biossurfactante de *Bacillus subtilis*

Todos os testes deste trabalho foram realizados com o lipopeptídeo TIM96, semi-purificado e liofilizado, gentilmente cedido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

Para a produção do biossurfactante, a bactéria foi cultivada em Caldo Surfactina (MORÁN et al., 2000) por 48h a 30 °C. Ao final do tempo de incubação, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado para a purificação do lipopeptídeo. O sobrenadante isento de células foi submetido à precipitação ácida, com HCl 12M pH 2.0, de acordo com a metodologia proposta por PEREIRA et al., (2013). O biossurfactante semi-purificado foi

identificado, através da técnica de espectrometria de massas ESI-Q-TOF, como sendo uma mistura de três famílias de lipopeptídeos: surfactina, iturina e fengicina. Para a avaliação antifúngica, os biossurfactantes foram redissolvidos em meio RPMI 1640 (Sigma chemical corporation, St. Louis, EUA) pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS estéril na concentração de 10mg/mL, filtrados em membrana estéril de 0,22µm e mantidos a -20°C.

## 6.4 Células planctônicas

### 6.4.1 Atividade antifúngica

Os testes de sensibilidade em células planctônicas seguiram o método de microdiluição em caldo preconizado no documento M27-A3, estabelecido pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Foi preparada uma solução estoque de TIM 96 em meio RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS; em seguida o material foi testado em concentrações que variaram de 4,882 µg/mL a 2500 µg/mL. Também foram testados os antifúngicos anfotericina B (AMB - Sigma chemical corporation, EUA), fluconazol (FLC - MERCK SHARP & Dohme, BRASIL) e voriconazol (VCZ – Pfizer, BRASIL), os quais foram diluídos em meio RPMI pH 7,0 e testados nos seguintes intervalos: 0,0313 µg/mL a 16 µg/mL para AMB e VCZ e 0,125 µg/mL a 64 µg/mL para FLC (CLSI, 2008).

Uma suspensão de células de *Trichosporon* spp. foi preparada em solução salina estéril (0,9% NaCl), ajustando a turbidez à escala 0,5 de MacFarland e em seguida, a suspensão foi diluída em proporção 1:50 e depois 1:20 em meio RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS. Aliquotas de 100 µL do inóculo final foram depositadas às microplacas previamente preparadas com 100 µL do meio de cultura suplementado com as drogas, distribuídas em diluições seriadas em escala 1:2. Foi utilizado como controle da qualidade do teste de sensibilidade, para os antifúngicos, a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

A interpretação do resultado foi realizada por meio de leituras visuais após incubação das placas a 35 °C por 48h (CLSI, 2008). A concentração inibitória mínima (CIM) para AMB foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico (CIM<sub>100%</sub>); para TIM96, foram determinados os valores de CIM<sub>50%</sub> e CIM<sub>100%</sub>, avaliando as menores concentrações capazes de inibir o crescimento fúngico em 50% e 100%, respectivamente. Já para FLC e VCZ, a CIM foi definida como 50% de inibição

do crescimento fúngico, em comparação com os controles livres de droga. Para a Concentração fungicida mínima (CFM), definida como o menor valor capaz de matar a célula fúngica, foi realizada segundo Cantón et al. (2004), com adaptações. A CFM foi determinada pela semeadura dos poços onde não foi observado crescimento. Para tanto, o conteúdo dos poços foi homogeneizado por meio de pipetagens e alíquotas de 100 µL foram semeadas em tubos contendo ágar batata. Os tubos foram incubados a 35°C por 48h para posterior inspeção visual.

Os experimentos a seguir tiveram como base os valores de CIM que foram capazes de inibir em 100% o crescimento fúngico para TIM96 e AMB. Para FLC, foi a concentração capaz de inibir o crescimento fúngico em 50%, como recomenda o documento M27-A3 (CLSI, 2008).

#### **6.4.2 Interações farmacológicas entre TIM96 e antifúngicos clássicos pelo método de checkerboard**

A interação entre TIM96 e os antifúngicos clássicos AMB e FLC, a *T. inkin* (n=1) CEMM 05-6-075, foi realizada de acordo como o método de *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez) em microdiluição em caldo (JOHNSON et al., 2004), com interpretação de resultados proposto por ODDS (2003). O biossurfacante TIM96 foi testado nas concentrações que variaram de (1,21875 a 78,125 µg/mL) associados a concentrações de AMB (0,0019 a 2µg/mL) e FLC (0,0078125 a 8 µg/mL). Após 48h de incubação a 35°C, as placas foram homogeneizadas e transferidas para novas placas de microtitulação de fundo chato e lidas em espectrofotômetro a 540nm.

A interação entre os fármacos e o TIM96 foi calculada pelo FICI (Índice de Concentração Inibitória Fracionada), por meio da soma das concentrações combinadas divididas pelas concentrações isoladas do TIM96 e de cada antifúngico. Dessa forma, temos:  $FICI \leq 0,5$  = sinergismo;  $FICI > 4,0$  = antagonismo; e  $0,5 < FICI < 4,0$  = sem interação (ODDS, 2003).

#### **6.4.3 Tempo de morte**

O ensaio de tempo de morte foi realizado de acordo com Cantón et al. (2003) com adaptações. As drogas testadas, TIM96 e AMB, foram diluídas em RPMI 1640 pH tamponado com 0,165 M de MOPS 7,0. Para TIM96, foram utilizadas as concentrações 2xCFM e CFM,

de cada cepa estudada. Quanto a AMB, foi utilizada a concentração CIM, também de cada cepa. Foram utilizadas as cepas CEMM 05-6-075, 01-1-143 e 01-1-145 como representativas da espécie *T. inkin*, e as cepas CEMM 05-6-072, 05-6-073 e 03-1-072, como representativas da espécie *T. asahii*. Para a confecção dos inóculos foi preparada uma solução de salina estéril, ajustando-se a turbidez à escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, essa solução foi diluída em 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS. Em seguida, alíquotas do inóculo final foram transferidas para tubos de ensaio estéreis, os quais já continham as concentrações a serem testadas de cada droga em meio RPMI 1640 pH 7,0 para cada cepa. Os tubos foram então incubados a 35°C e analisados nos intervalos de tempo 0, 2, 4, 6 e 24h, por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Em cada corte de tempo, alíquotas de 100 µL dos poços inoculados eram retiradas, diluídas em salina estéril (1:10) e semeadas em placas contendo ágar batata. As placas foram incubadas a 35°C por 48h, para a posterior contagem de colônias.

#### **6.4.4 Efeito do tim96 sobre o teor de ergosterol de células planctônicas**

O ensaio de redução do ergosterol foi realizado conforme descrito por Moran et al., (2007), com adaptações. Foram utilizadas as cepas CEMM 05-6-075, 01-1-143 e 01-1-145 como representativa da espécie *T. inkin*, e as cepas CEMM 05-6-072, 05-6-073 e 03-1-072, como representativas da espécie *T. asahii*, além de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, como controle positivo do teste, afim de elucidar se o mecanismo de ação do biossurfactante envolve a redução do teor totais de esteróis. FLC foi utilizado como controle de qualidade da droga, em sua concentração CIM, uma vez que diminui a síntese do ergosterol, bloqueando a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica e impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Primeiramente a cepa foi repicada em ágar batata e incubada a 35°C por 48h. Após o período de incubação, foi montado um sistema de icrodiluição em caldo. Foi utilizado como meio de cultura RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS. Posteriormente, o inóculo foi ajustado na escala 0,5 de MacFarland em salina 0,9% estéril, sendo diluído em RPMI nas escalas 1:50 e 1:20 (CLSI, 2008). O inóculo ajustado foi transferido para os poços previamente preparados com o surfactante em suas concentrações CIM/2 e CIM/4 e FLC, em sua concentração CIM, sendo incubados por 48 h a 35 °C. Como controles de crescimento positivo, foram incubados apenas o fungo com RPMI. Após a incubação, o volume de cada tubo foi homogeneizado e transferidos para eppendorf estéreis. Diluições seriadas de 1/10

foram realizadas em salina 0,9% estéril, até atingir a escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  céls/mL. Cerca de 1mL de cada cultura foi centrifugada por 5 minutos a 12.000g e o *pellet* obtido foi resuspenso em 500 µL de KOH/EtOH e incubado em banho maria a 95 °C durante 1 h. Em seguida, foi adicionado 600 µL de hexano a cada microtubo, o qual foi homogeneizado em vortex. As soluções foram novamente centrifugadas a 12.000g por 5 minutos e toda a camada superior do hexano, a qual concentrava os esteróis totais foi removida, transferida para tubos estéreis. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 295 nm. A quantificação dos esteróis totais da membrana foi realizada em comparação com uma curva padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich, EUA) (CORDEIRO et al., 2014). Toda a experimentação foi realizada em duplicata.

#### **6.4.5 Dano à membrana celular**

O efeito do biossurfactante TIM96 sobre a integridade da membrana foi realizado seguindo a metodologia de DEVI et al., (2010), com modificações. Para este estudo, foram utilizadas as cepas CEMM 05-6-075, 01-1-143 e 01-1-145 como representativas da espécie *T. inkin*, e as cepas CEMM 05-6-072, 05-6-073 e 03-1-072, como representativas da espécie *T. asahii*. Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente para o teste de sensibilidade e diluídos em proporção 1:50 e depois 1:20 em RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS. Volume de 100 µL dos inóculos foram transferidos para poços de placas de microdiluição de 96 cavidades contendo RPMI pH 7,0 suplementado com TIM96 nas concentrações CIM, CIM/2 e CIM/4, para cada cepa testada. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. Para o controle positivo do ensaio, foi empregado a droga feniletilideno (*N*'-[(*E*)-1-(fenil)etilideno]piridina-4-carbohidrazida), uma hidrazida derivada da hidrazona, cujo mecanismo de ação antifúngica envolve dano à membrana plasmática e, por conseguinte, positividade ao teste ora descrito (CORDEIRO et al., 2014), em concentrações CIM/2 e CIM/4. Após o período de incubação, as suspensões foram homogeneizadas, centrifugadas a  $13,416 \times g$  durante 10 min e transferidas para novas placas de microdiluição. Aliquotas de 2 µL do sobrenadante foram então coletadas e analisadas em 260 nm e 280 nm para ácidos nucleicos e proteínas respectivamente, em Nanodrop® (Thermo Scientific, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata.

### 6.4.6 Citotoxicidade

#### 6.4.6.1 Cultura de células e avaliação da atividade citotóxica

A linhagem de monócitos/macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantida em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100U/L de penicilina e 100U/L de estreptomicina, DMEM completo (DMEMc) em uma atmosfera de 95% ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C. As células serão subcultivadas após atingir uma confluência de 80% (KÄMMERER *et al.*, 2011). Para avaliar a citotoxicidade do TIM96 foi utilizado o ensaio do MTT (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) (Mosmann, 1983), que se baseia no fato deste sal {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) - 2,5 - difeniltetrazólio]} ser reduzido pelas mitocôndrias das células viáveis a um composto (sal de formazan), sendo a quantidade deste um indicativo da viabilidade celular. As células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/ mL em placa de 96 poços. As células foram incubadas com TIM96 (39,06 - 5000 µg/mL) por 24 horas. Após este período, foi adicionado o MTT (5mg/mL) e as células foram então incubadas por mais 3h. Após isto, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se DMSO, e decorridos 15 min de agitação, a absorbância foi mensurada em 540 nm (Freshney, 1994; Sung et al., 2010; Wang et al., 2016).

#### 6.4.7 Alteração na hidrofobicidade celular

O ensaio de hidrofobicidade foi realizado de acordo com Anil et al., (2001), com modificações. Para tanto, foram utilizadas as cepas CEMM 05-6-075, 01-1-143 e 01-1-145 como representativas da espécie *T. inkin*, e as cepas CEMM 05-6-072, 05-6-073 e 03-1-072, como representativas da espécie *T. asahii*, as quais foram cultivadas em tubos de ensaio estéreis, contendo meio RPMI pH 7,0 suplementado com TIM96 (CIM/2 e CIM/4). Para o controle positivo do teste, foi empregado o anti-séptico químico clorexidina, segundo Anil et al., (2001), que sabe-se possuir mecanismo antifúngico capaz de alterar a hidrofobicidade celular, representando positividade ao teste. Para este, foi utilizado sua concentração (CIM/2). Os tubos contendo 6 mL de células ajustadas na escala 0,5 de McFarland, foram incubadas a 35°C sob agitação de 80 rpm por 48h. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 2500 xg por 5min. o sobrenadante foi descartado e precipitado obtido foi lavado com tampão PBS; em seguida, repetiu-se o procedimento a fim de remover o meio de cultura ao máximo. Os volumes foram completados para 10 mL com PBS e divididos em quatro tubos, representando

dois controles e dois testes, cada um contendo 2,5 mL de volume final. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL de xilol (Dinâmica, Brasil) tanto nos tubos controles, quanto nos testes; o material foi incubado em banho-maria a 37°C por 10 minutos, homogeneizados em vórtex por 15 segundos e novamente incubados em banho-maria a 37°C por 30 min, para promoção da separação das fases imiscíveis.

Após essa etapa de incubação, a fase aquosa, inferior, foi cuidadosamente recolhida por pipetagem e transferida para tubos de hemólise, os quais foram vortexados vigorosamente por 15 segundos. Os resíduos restantes de xilol foram evaporados por fluxos de ar unidirecionados aos tubos por 2 minutos, ou até não perceber mais restos de xilol no sistema. A absorbância dos tubos controles e testes foram lidas em espectofotômetro a 540nm. RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS estéril foi utilizado como controle negativo do teste.

O índice de hidrofobicidade superficial celular (IHSC) foi calculado de acordo com Borghi et al., (2011), utilizando-se a fórmula da figura 1, na qual a densidade ótica (DO) controle é a densidade ótica do controle antes do tratamento com xilol e DO teste é a densidade ótica do teste depois do tratamento com xilol.

Quadro 1: Equação para determinação do IHSC em células incubadas por 48h em contato com o TIM96 e Clorexidina.

$$\text{IHSC} = \frac{(\text{DO controle} - \text{DO teste})}{\text{DO controle}} \times 100$$

## 6.5 Obtenção do biossurfactante de *Bacillus subtilis*

### 6.5.1 Formação de biofilme

#### 6.5.1.1 Efeito do TIM96 na adesão celular

No presente estudo, os biofilmes de *Trichosporon* spp. foram formados segundo metodologia descrita por Cordeiro et al., (2015). A fim de investigar o efeito do TIM96 sobre a adesão celular, culturas de *T. asahii* (n=4) e *T. inkin* (n=6) foram inicialmente mantidas em ágar batata por 48h a 35 °C. Após esse período, foram preparadas suspensões fúngicas em RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS e suas densidades foram ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/mL com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. Em seguida, 100 µL de

cada inóculo foi transferido para micropoços de placas de 96 cavidade de fundo chato, previamente preparados com igual volume de RPMI pH 7,0 suplementado com TIM96 em concentração 10xCIM para cada cepa. Como controle positivo do teste foi empregado AMB, também na concentração 10xCIM para cada cepa. As placas foram incubadas a 35°C sob agitação de 80 rpm por 6 horas (CORDEIRO et al., 2015). Decorrido esse tempo, os sobrenadantes foram aspirados e os poços lavados duas vezes com PBS-Tween 20 (0,005% v/v) e a capacidade de formação de cada um dos biofilmes foi avaliada quanto a sua viabilidade por meio de ensaio de colorimetria por XTT (2,3-bis (2-metóxi-4- nitro-5-sulfenil) - 5 - [(fenilamino)carbonil] - 2H - hidróxido de tetrazólio), conforme o sub-item 6.5.2.1.

#### 6.5.1.2 Efeito do TIM96 no desenvolvimento do biofilme

Os biofilmes foram formados conforme Cordeiro et al. (2015) com um inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL. O potencial anti-adesivo do TIM96 foi avaliado frente a biofilmes em formação, com análises de tempo em 24 e 48 h de crescimento. AMB foi utilizado como droga padrão e controle positivo do teste. Passado o período de adesão de 6 h, todo o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e os poços contendo os biofilmes foram lavados com PBS-Tween 20 estéril. As drogas TIM96 e AMB, diluídas em RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com MOPS, foram acrescidas aos biofilmes, num volume de 200  $\mu$ L em suas concentrações 10xCIM para cada cepa. Após cada intervalo de tempo (24 e 48 h), os biofilmes foram lavados com PBS – Tween 20 estéril e analisados quanto a sua viabilidade por XTT (item 5.1.2.2), e por coloração do cristal violeta (5.1.2.4). Toda a experimentação foi conduzida em triplicata.

#### 6.5.1.3 Efeito do TIM96 sobre o biofilme maduro

Os biofilmes foram formados conforme Cordeiro et al. (2015), com um inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL. Após o período de maturação de 48 h, os biofilmes foram lavados com PBS – Tween 20 estéril, e as drogas TIM96 e AMB, diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, pH 7,0, foram testadas frente aos biofilmes em suas concentrações 10xCIM para cada cepa, afim de avaliar o seu potencial antifúngico sobre os biofilmes maduros. As placas foram incubadas por mais 48h, nas condições descritas acima.

## **6.5.2 Métodos quantitativos para a avaliação de resultados em biofilmes**

### **6.5.2.1 Atividade metabólica**

A análise da viabilidade foi realizada por meio de ensaio de colorimetria por XTT, conforme Martinez e Casadevall, (2006), com adaptações. Após lavagem com PBS, os poços contendo os biofilmes foram preenchidos com 50 µL de PBS estéril, 75 µL de XTT estéril (1mg/mL em PBS – Sigma, EUA) e 6 µL de menadiona (1 mM em acetona – Sigma, E.U.A). As placas foram incubadas a 35 °C, 80 rpm por 5 h, ao abrigo da luz direta. Após o período de incubação, a solução de XTT foi coletada, transferida para novos poços de fundo chato e as placas lidas em espectrofotômetro a 492nm. A mudança colorimétrica que reduziu o XTT a formazan é resultante da atividade metabólica celular, inferida pela atividade das desidrogenases mitocondriais (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

### **6.5.2.2 Biomassa**

Após a lavagem com PBS, os biofilmes foram desidratados com metanol (Dinamica, Brasil) por aproximadamente 5 min. O sobrenadante foi removido e secas ainda dentro da cabine de fluxo laminar. Passado esse processo de secagem, foram adicionados 200 µL de cristal violeta a 0,3% em cada poço. O conteúdo foi retirado e cada poço foi lavado levemente com água destilada estéril, por duas vezes, 30 minutos após a adição do cristal violeta. Após as lavagens, o corante foi removido com a adição de 200 µL de ácido acético a 33%, que permaneceu em contato com os biofilmes por 30 segundos. O sobrenadante foi então removido e transferido para novas placas de microtitulação de fundo chato e lidos em espectrofotômetro a 590 nm (Peeters et al., 2008) Toda a experimentação foi realizada em triplicata.

## **6.6 Fisiologia dos biofilmes**

### **6.6.1 Microscopia confocal**

A influência do biossurfactante TIM96 sobre a viabilidade e ultraestrutura dos biofilmes de *Trichosporon* spp. foi avaliada pela técnica de microscopia confocal, de acordo com Di Bonaventura et al., (2006). Foram adicionados sobre os biofilmes, alíquotas do corante *Live/Dead* TM (Invitrogen, EUA), e levados para observação em Microscópio Confocal Nikon C2, com comprimento de onda a 488nm para a detecção do corante Syto9,

que identifica células viáveis na cor verde, e a 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, o qual identifica células não viáveis. Para a análise das imagens, pontos equidistantes foram selecionados a partir das imagens tridimensionais do biofilme e a quantificação colorimétrica foi realizada utilizando o software ImageJ 1.50i (COLLINS, 2007).

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Células planctônicas**

#### ***7.1.1 Sensibilidade das células planctônicas de *Trichosporon* spp. Ao TIM96 e aos antifúngicos***

A sensibilidade das células planctônicas das espécies de *T. asahii* e *T. inkin* frente ao biossurfactante TIM96, bem como aos antifúngicos AMB e FLC, está apresentada na tabela 1.

Observou-se que o TIM96 inibiu o crescimento das cepas de *Trichosporon* spp. utilizadas neste estudo, em valores de CIM que variaram de 156,25 a 312,5 µg/mL. Já para AMB, os valores de CIM variaram de 0,0312 a 2 µg/mL e para FLC foram encontrados valores de CIM variaram de 1 a 8 µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de TIM 96 e concentração inibitória mínima de anfotericina B e fluconazol isolados, frente a cepas de *T. inkin* e *T. asahii*.

CIM (µg/mL)						
	Cepa	TIM96		AMB	FLC	VCZ
		50%	100%			
<i>T. asahii</i>	CEMM 05-6-072	39,06	78,125	0,125	8	0,125
	CEMM 05-6-073	156,25	312,5	2	4	0,125
	CEMM 03-1-072	78,125	312,5	1	1	0,0312
<i>T. inkin</i>	CEMM 01-1-143	78,125	156,25	0,125	2	0,0625
	CEMM 01-1-144	78,125	156,25	0,5	2	0,0625
	CEMM 01-1-145	78,125	156,25	0,0312	2	0,0312
	CEMM 05-6-057	78,125	156,25	2	1	0,0312
	CEMM 05-6-074	78,125	156,25	0,125	1	0,0312
	CEMM 05-6-075	78,125	156,25	0,25	2	0,125
	CEMM 03-1-073	156,25	312,5	0,25	4	0,0625

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; TIM96: Biossurfactante extraído de cepas de *Bacillus subtilis*; AMB: Anfotericina B; FLC: Fluconazol.

### 7.1.2 Interações farmacológicas entre TIM96 e antifúngicos clássicos pelo método de checkerboard

Não foram observadas interações do tipo sinergismo nem antagonismo entre as combinações formadas com TIM96 e os antifúngicos AMB e FLC. Os valores de FICI obtidos indicam antagonismo entre TIM96 e os antifúngicos (FICI > 4,0).

### 7.1.3 Tempo de morte

A atividade fungicida de TIM96 foi avaliada em períodos estabelecidos de tempo (0, 2, 4, 6 e 24 h), para todas as cepas utilizadas. AMB foi o controle positivo do teste, uma

vez que já se conhece o seu potencial como fungicida. O declínio do número de colônias foi observado a partir da 6ª hora de incubação, com morte total para ambas as concentrações de TIM96, na 24ª hora. Para AMB, observou-se com exceção de uma cepa (CEMM 05-6-075), o declínio também a partir da 6ª hora, embora nos períodos estudados, *Trichosporon* sp., mostrou-se capaz de sobreviver às concentrações estudadas até 48 h. Os resultados do teste podem ser observados nas figuras 6, 7 e 8:

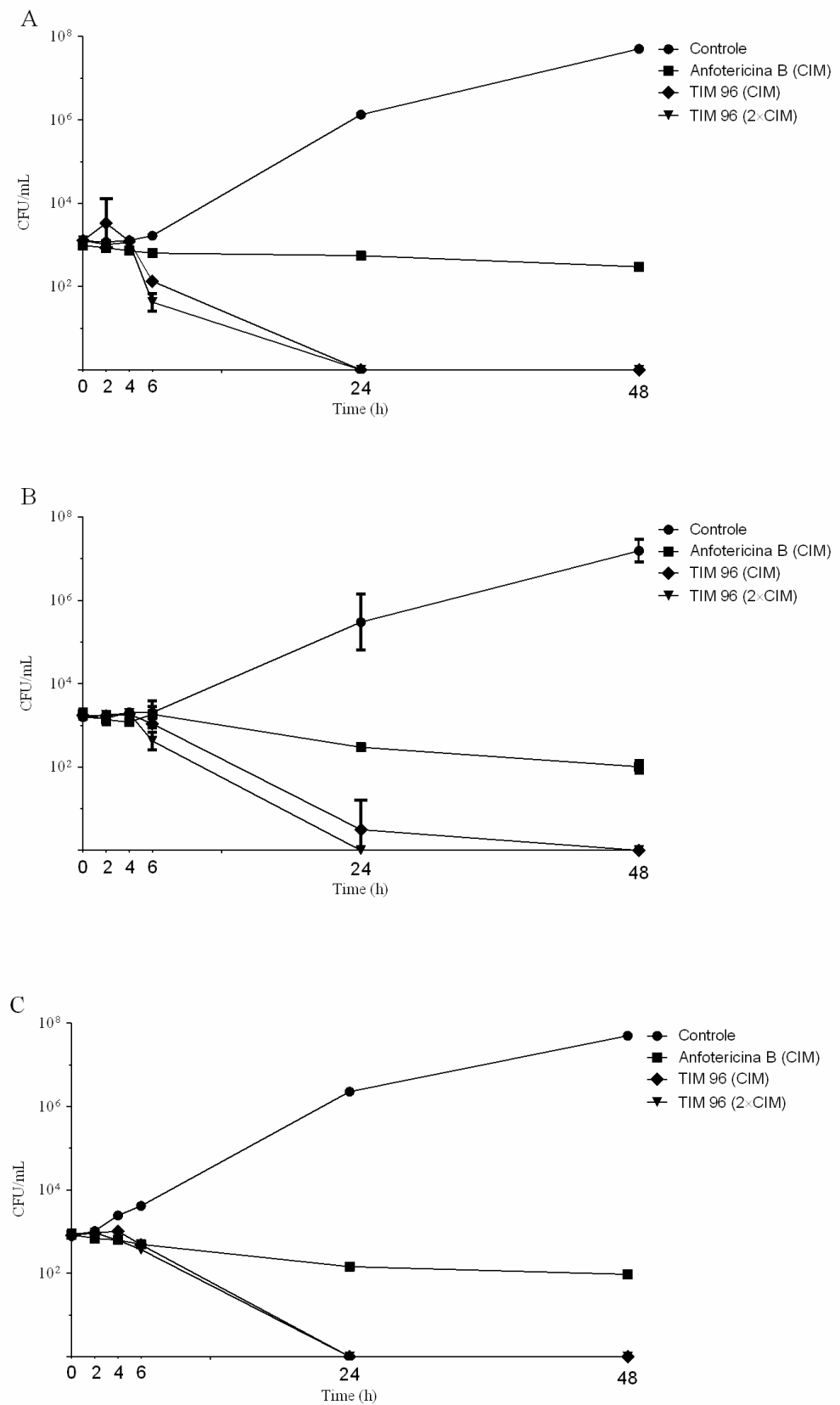


Figura 5 - Tempo de morte representativo de *T. asahii* após a exposição ao TIM96 e AMB, para as seguintes cepas: (A) CEMM 05-6-072, (B) CEMM 05-6-073 e (C) CEMM 03-1-072.

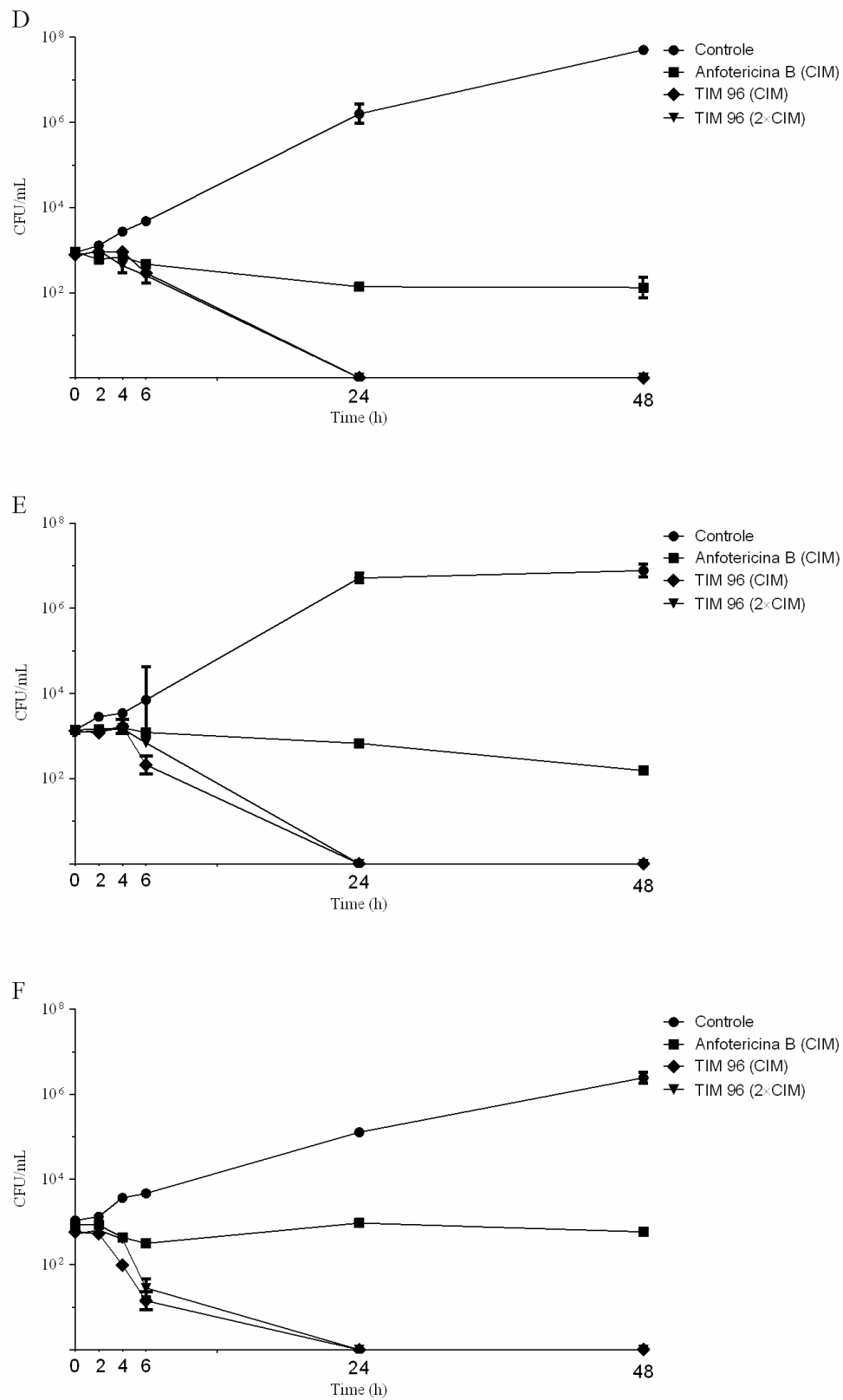


Figura 6 - Tempo de morte representativo de *T. inkin* após a exposição ao TIM96 e AMB, para as seguintes cepas: (C) CEMM 01-1-143, (D) CEMM 01-1-145 e (E) CEMM 05-6-075.

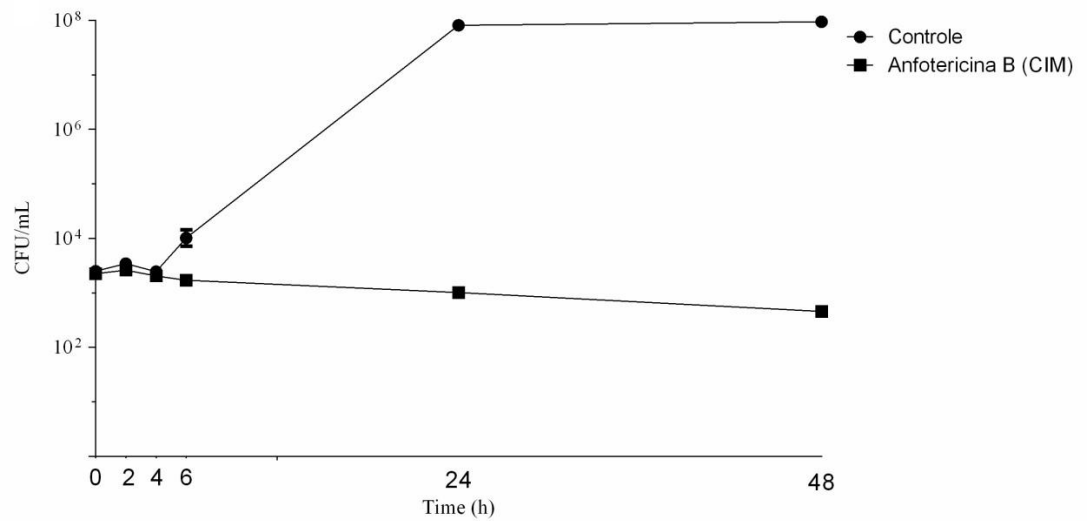


Figura 7 - Tempo de morte de *C. parapsilosis* ATCC 22019, em incubação com AMB a 2µg/mL (valor de CIM).

#### 7.1.4 Influência do TIM96 sobre o teor de ergosterol celular

O teor de ergosterol foi determinado para cada cepa avaliada no teste, em diferentes concentrações das drogas em estudo (CIM/2 e CIM/4) para TIM96 e (CIM) para FLC. Depois do período de incubação com a droga, observou-se uma redução significativa do teor de ergosterol em ambas as concentrações de TIM96 utilizadas no teste. FLC foi utilizado como controle positivo do teste e os resultados podem ser observados na figura 9:

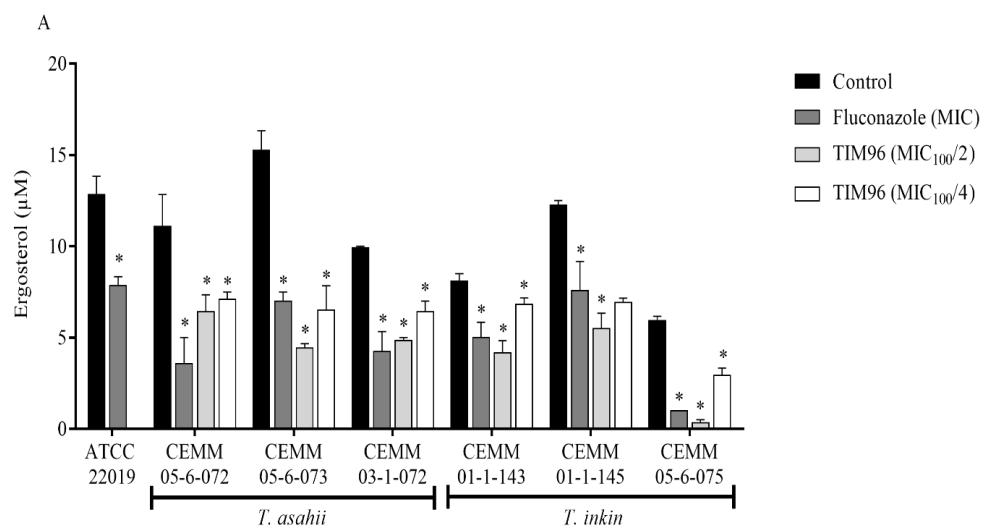


Figura 8 - Teor de ergosterol em cutivos planctônicos de *Trichosporon* spp. em RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com 0,165 M de MOPS sem antimicrobiano (barras pretas), representando os controles, ou suplementado com TIM96 CIM/2, TIM96 CIM/4 ou ainda, Fluconazol (FLC). *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CP) incubada com FLC para controle do teste. Os asteriscos indicam as diferenças estatísticas significativas em relação aos

controles ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão.

### 7.1.5 Efeito do TIM96 sobre o dano à membrana celular

O efeito do TIM 96 e da droga feniletilideno sobre a membrana celular de *Trichosporon* spp. está exposto na figura 10, para dosagens de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente.

Observou-se que o biossurfactante TIM 96 foi eficiente em causar dano sobre integridade da membrana celular das cepas de *Trichosporon* spp., de forma significativa, em 3 das 4 cepas estudadas em suas concentrações CIM, CIM/2 e CIM/4. Da mesma forma, o feniletilideno, controle positivo do teste, foi eficaz em suas concentrações CIM/2 e CIM/4, para todos os isolados clínicos. Para a análise de proteínas, o biossurfactante não apresentou diferenças, em relação ao controle, apenas para um dos isolados clínicos testados, em concentrações CIM e CIM/2. Já para Feniletilideno, sua concentração CIM/4, foi o suficiente para danificar a membrana a ponto de liberar proteínas para o sobrenadante. Resultados do teste são apresentados nas figuras 10:

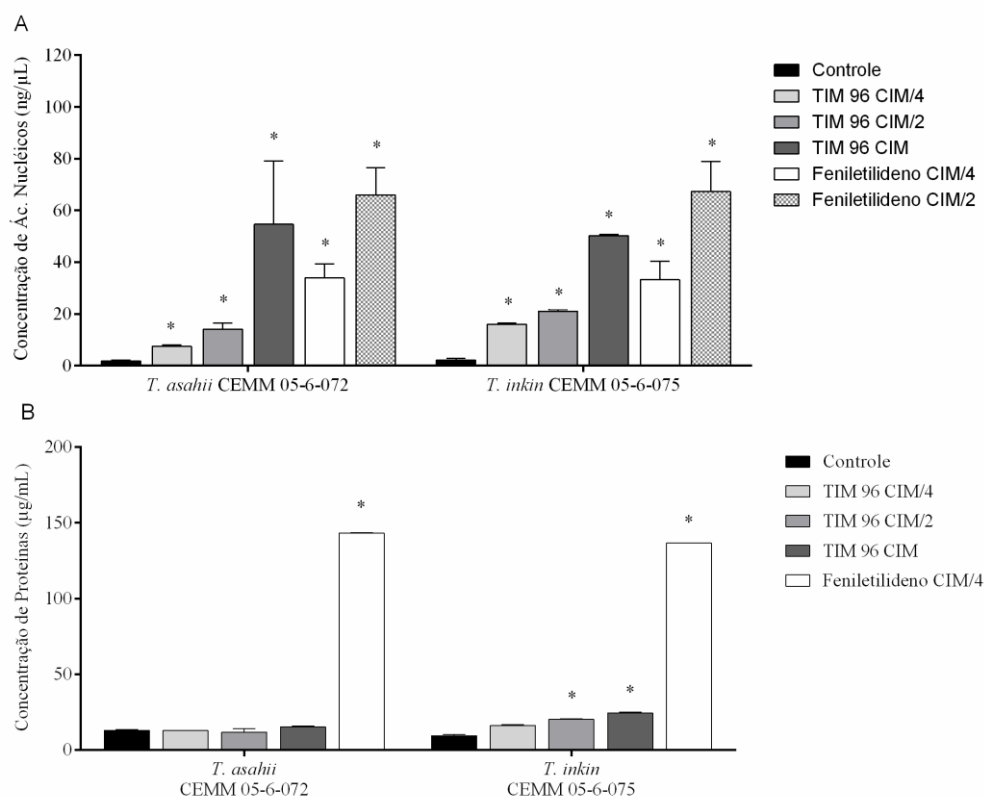


Figura 9 - Absorbância do conteúdo extracelular dos isolados de *Trichosporon* após exposição a diferentes

concentrações de TIM96 e feniletilideno, testados isoladamente. Leitura realizada em 260 nm (A) para detectar a concentração de ácidos nucleicos e 280 nm para detectar a concentração de proteínas (B). Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).

### 7.1.6 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade do TIM96 revelou um comportamento tóxico sobre culturas de células de macrófagos murinos RAW 264.7. O resultado do comportamento do TIM96 sobre essas células pode ser observado na figura 11:

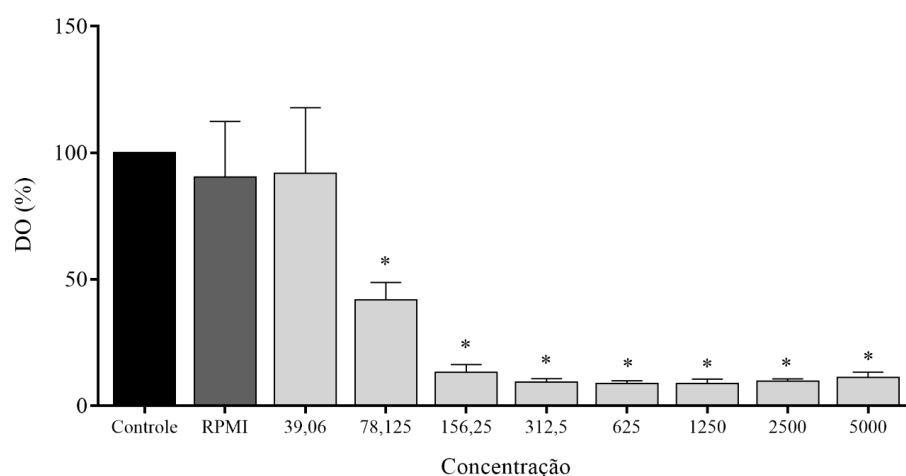


Figura 10 - Atividade citotóxica do TIM96 sobre culturas de células RAW264.7. TIM96 (barras cinzas) mostrou-se tóxico a partir da concentração 78,125  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).

### 7.1.7 Alteração na hidrofobicidade celular

O efeito causado pelo TIM96, em suas concentrações sub-inibitórias, sobre a hidrofobicidade da superfície celular foi de redução. A exposição à droga por um período de 48 h foi capaz de reduzir significativamente, em relação aos controles, a sua hidrofobicidade, com exceção do isolado clínico CEMM 05-6-073. Clorexidina, utilizada como controle positivo do teste, obteve resultados semelhantes em sua concentração sub-inibitória. Os resultados podem ser observados na figura 12:

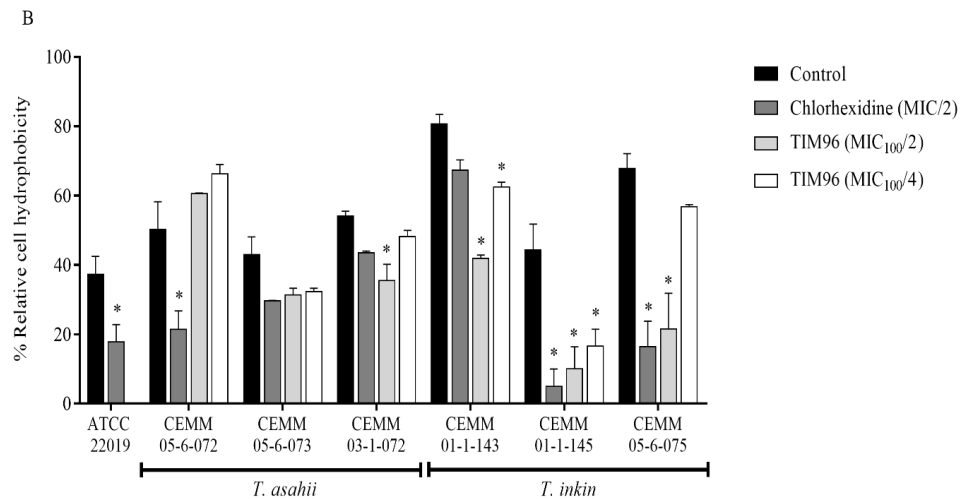


Figura 11 - Hidrofobicidade celular superficial relativa de *T. asahii* (n=3) e *T. inkin* (n=3), após 48 h de exposição a TIM96 ou Clorexidina em suas concentrações sub-inibitórias. Controle do teste realizado com *C. parapsilosis* ATCC 22019. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).

## 7.2 Células associadas em biofilme

### 7.2.1 Máxima formação dos biofilmes

A máxima formação dos biofilmes de *Trichosporon* está exposta na figura 13. Resultados realizados a partir da técnica de cristal violeta e expressos em absorbância a 540 nm. Uma vez que todas as cepas de *Trichosporon* utilizadas neste estudo se mostraram boas formadoras de biofilmes, decidiu-se trabalhar com todas para os ensaios a seguir.

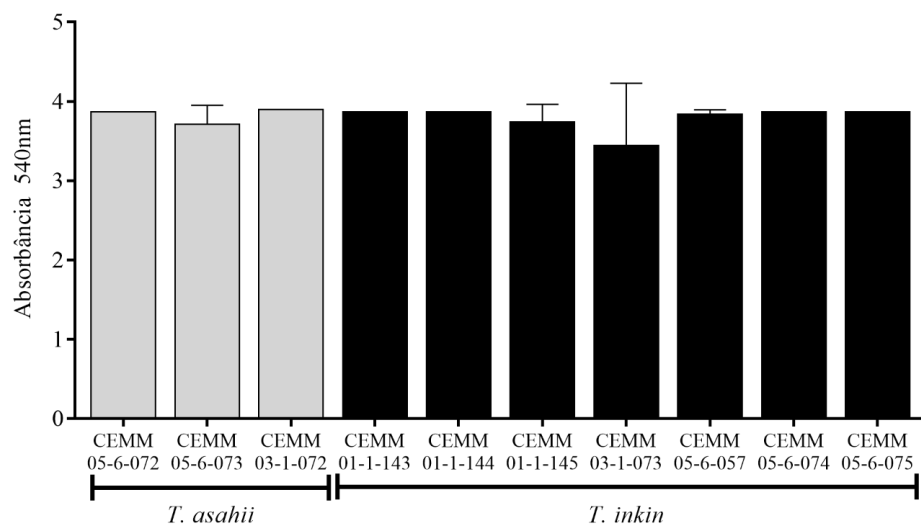


Figura 12 - Capacidade de formação de biofilme de isolados de *T. asahii* (barras cinza-claro) e *T. inkin* (barras pretas), utilizando a metodologia de quantificação de biomassa por cristal violeta.

### 7.2.2 Efeito do TIM96 sobre a adesão do biofilme

O efeito do potencial inibitório do TIM 96 sobre a capacidade de adesão das cepas de *Trichosporon* spp., bem como a sensibilidade a AMB, um fármaco que se sabe, tem um alto potencial antifúngico, está à mostra na figura 14. TIM96 e AMB inibiram ( $p<0,05$ ) as células e consequentemente, o biofilme. Asteriscos representam diferença estatística significativa em comparação com o controle.

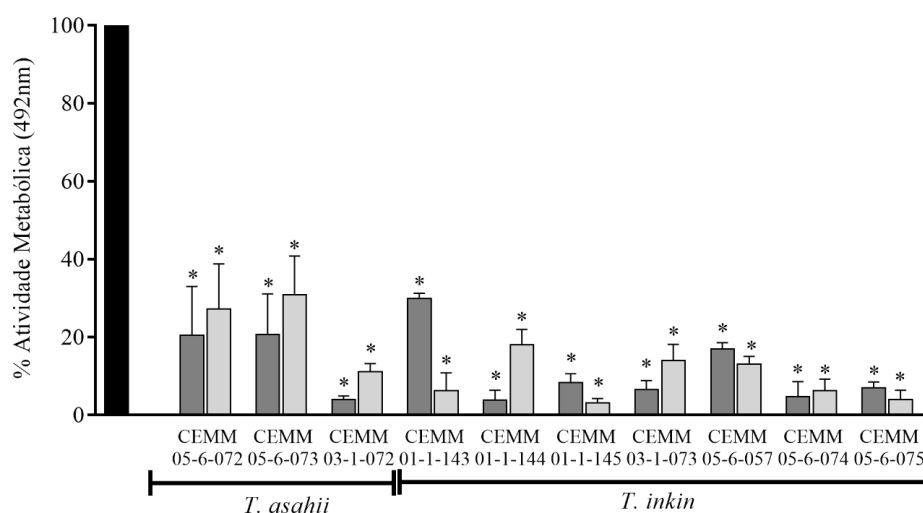


Figura 13 - Adesão de células à superfície expostas ao TIM 96 (barras cinza-claro) e AMB (barras cinza-escuro), ambas isoladamente, nas concentrações 10XCIM, após o período de adesão de 6 h. Controles positivos estão representados pela barra preta. A quantificação se deu por meio da metodologia de redução do XTT. Resultados expressos em porcentagem. Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p<0,05$ ).

### 7.2.3 Efeito do TIM96 sobre o biofilme em formação

No tocante a formação do biofilme, em 24 h de crescimento, os valores de inibição para TIM 96 e AMB, estão representados na figura 15, frente a cepas de *T. inkin* e *T. asahii*, respectivamente.

Foi observado que em 24 h de crescimento os valores de inibição do TIM 96 e AMB continuam interferindo no processo de formação dos biofilmes ( $p<0,05$ ), tanto para a análise por redução do XTT, quanto para a análise de biomassa.

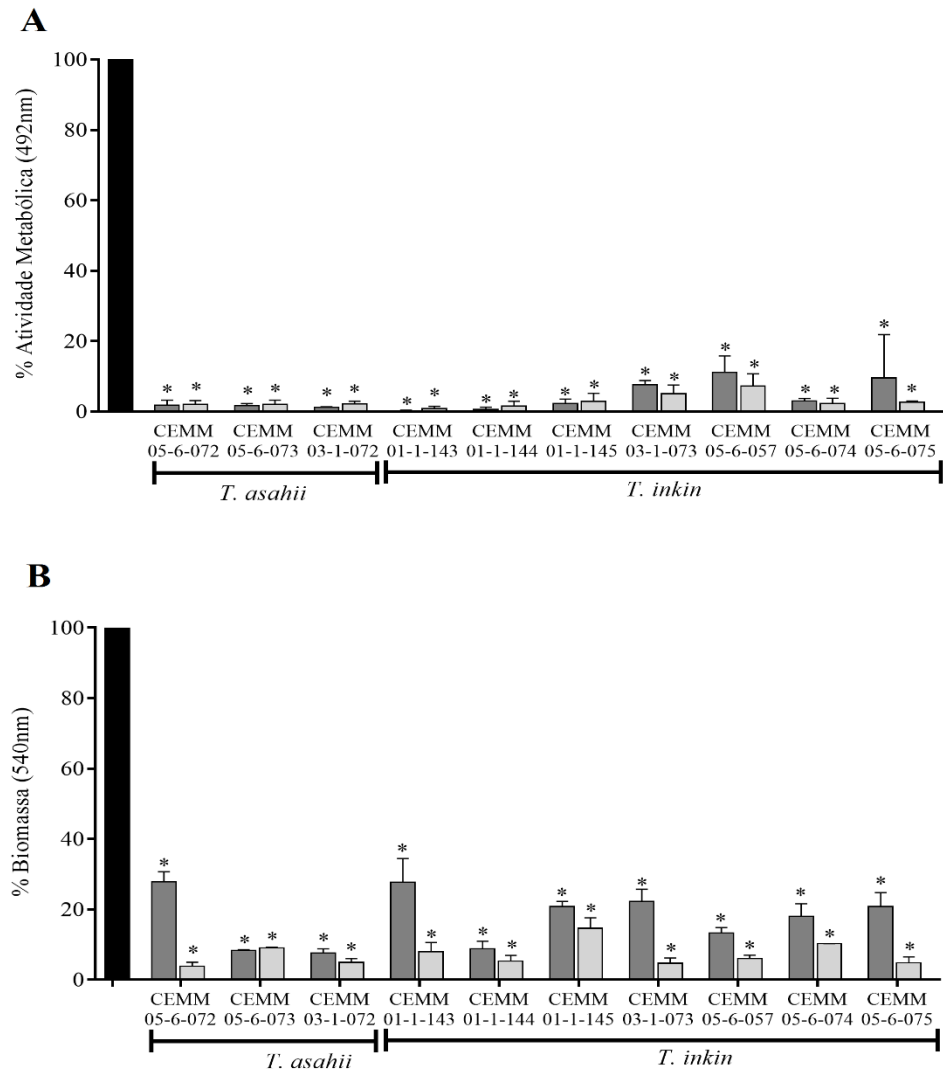


Figura 14 - Potencial inibitório de TIM96 (barras cinza-claro) e AMB (barras cinza-escuro), isoladamente, em suas concentrações 10XCIM, frente a cepas das espécies de *T. asahii* (n=4) e *T. inkin* (n=6), após 24 h de crescimento. Controles positivos foram representados por barras pretas. A quantificação dos resultados se deu por meio da redução do XTT (A) e por cristal violeta (B). O resultado foi expresso em porcentagem relativa de 492 e 540nm, isoladamente. Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p<0,05$ ).

Na análise de 48 h de formação dos biofilmes, ainda se percebe pouca atividade metabólica dos biofilmes, bem como pouca biomassa, mostrando que as concentrações 10XCIM utilizadas de ambas as drogas, ainda são eficazes em interferir significativamente ( $p<0,05$ ) com a formação dos biofilmes. Os resultados de viabilidade e biomassa são mostrados, respectivamente na figura 16:

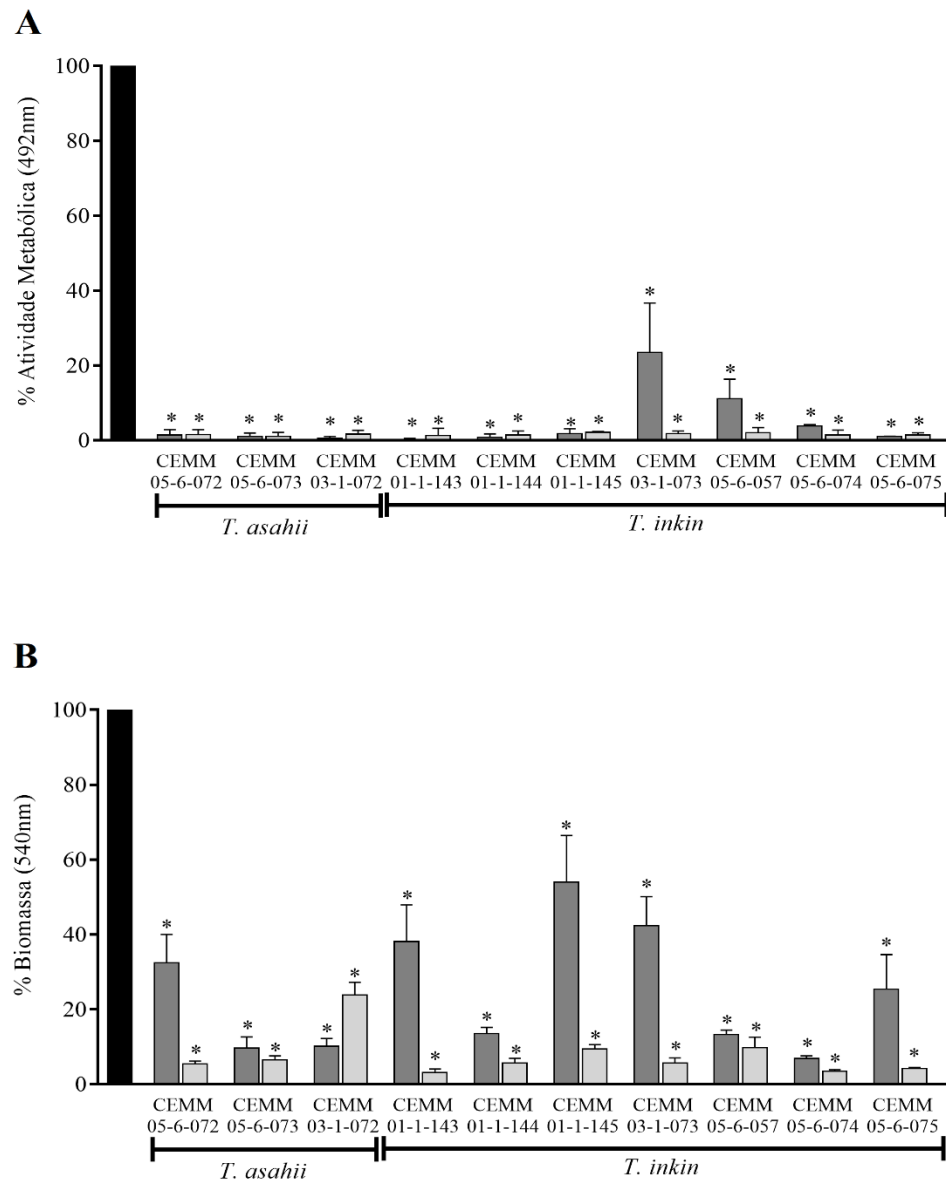


Figura 15 - Potencial inibitório de AMB (barras cinza-escuro) e TIM96 (barras cinza-claro), isoladamente, em suas concentrações 10XCIM, frente a cepas das espécies de *T. asahii* (n=4) e *T. inkin* (n=6), após 48 h de crescimento. Controles positivos livres de antimicrobianos foram representados por uma barra preta. A quantificação dos resultados se deu por meio da redução do XTT (A) e por cristal violeta (B). O resultado foi expresso em porcentagem relativa de 492 e 540nm, isoladamente. Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p<0,05$ ).

#### 7.2.4 Efeito do TIM96 sobre o biofilme maduro

O tratamento dos biofilmes maduros com concentrações de 10XCIM de TIM96 interferiu significativamente na viabilidade de 8 das 10 cepas ( $p<0,05$ ) e concentrações 10XCIM de AMB, em 3 das 10 cepas testadas ( $p<0,05$ ), como observado na figura 17:

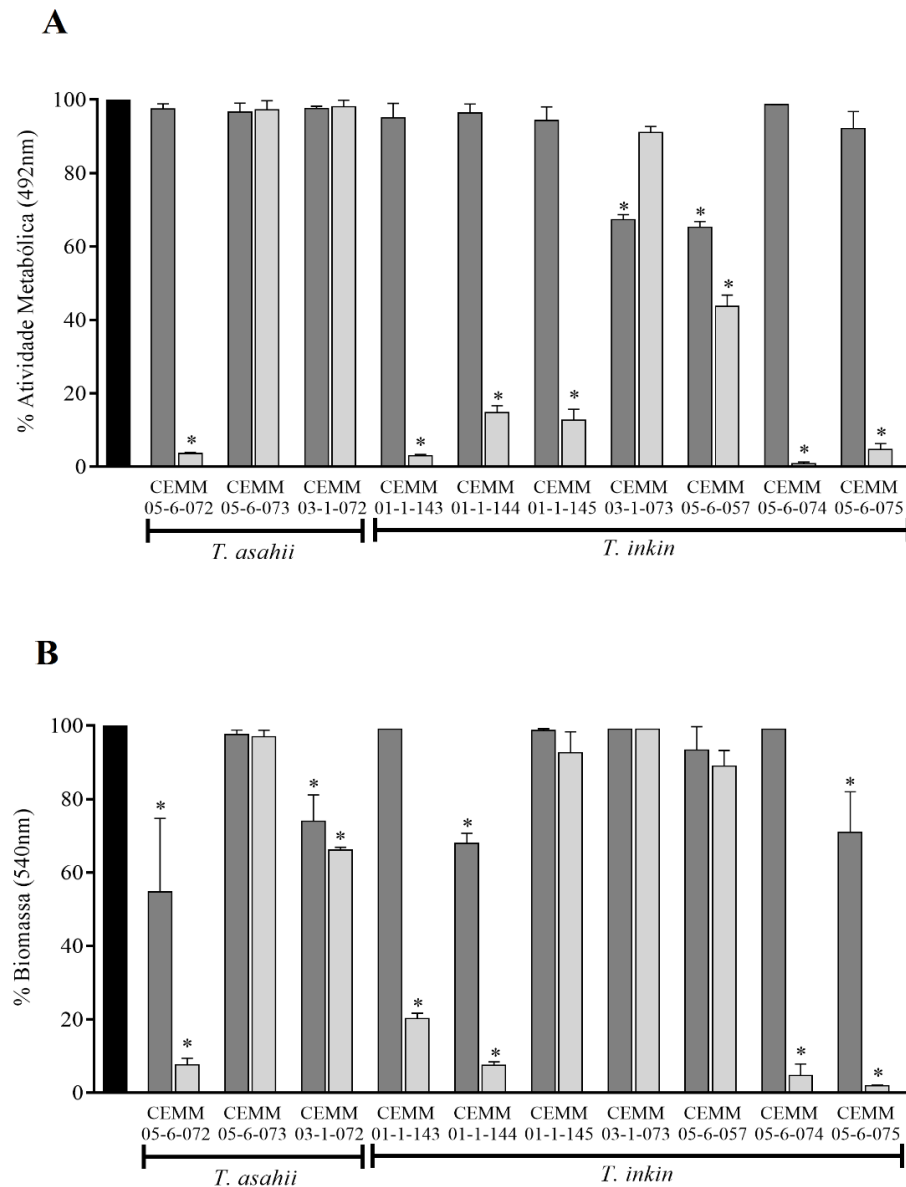


Figura 16 - Sensibilidade dos biofilmes maduros ao TIM96 e AMB, separadamente. Controles sem adição de antimicrobianos (barra preta). 10XCIM (barras cinza-escuro), 10XCIM de TIM96 (barras cinza-claro), foram testados para se avaliar por meio da redução de XTT e análise de biomassa por cristal violeta. Asteriscos (\*) representam diferença estatística significativa em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ). Resultados expressos em porcentagem.

## 7.3 Fisiologia dos biofilmes

### 7.3.1 Microscopia confocal

Alterações estruturais nos biofilmes e em células associadas a esses biofilmes após a exposição a TIM96 foram observadas utilizando-se microscopia confocal (figura 18). Além da fragmentação do biofilme e uma redução das células viáveis, como observado em (A e D),

também, uma redução na espessura do biofilme na concentração testada quando comparado ao seu respectivo controle. Além disso, as imagens revelaram que os biofilmes produzidos por *T. asahii* eram compostos por densas massas de blastoconídios viáveis, hifas e pseudo-hifas. TIM96 causou uma redução significativa na biomassa (G) e espessura (H) dos biofilmes de *Trichosporon*.

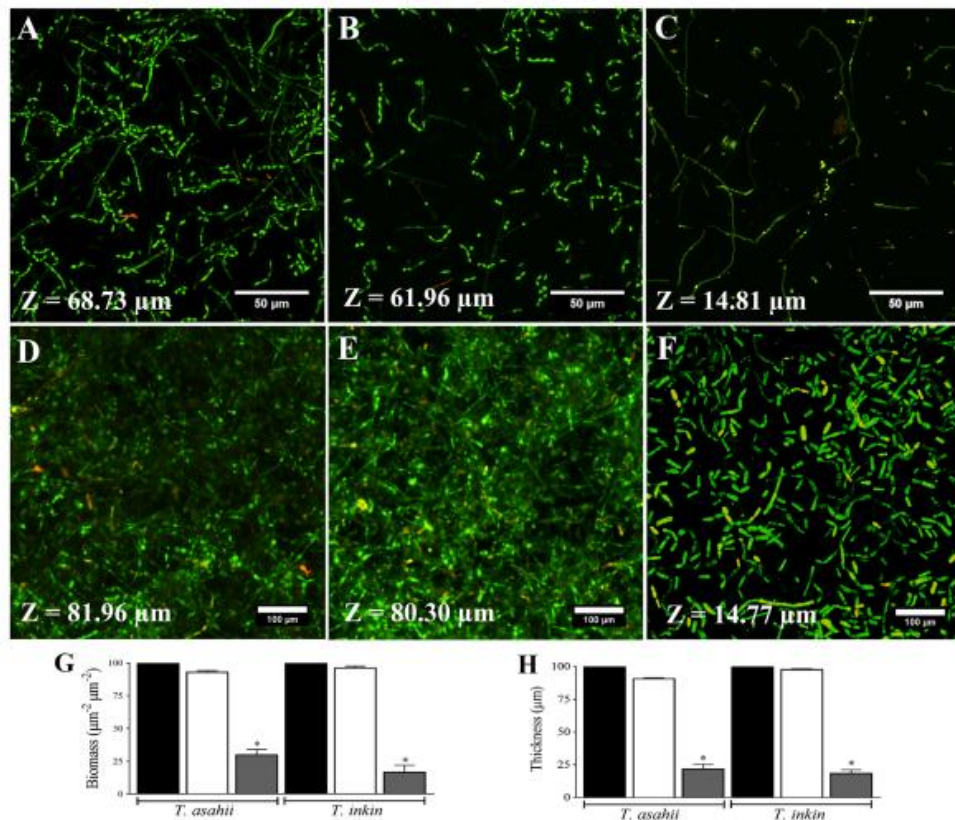


Figura 17 - Imagens de microscopia confocal de *T. asahii* CEMM 05-6-072 e *T. inkin* CEMM 05-6-074. Controle de crescimento de biofilme livre de drogas (A e D, respectivamente), após exposição a 10  $\times$  CIM AMB (B e E, respectivamente) e 10  $\times$  CIM TIM96 (C e F, respectivamente). Biomassa (G) e espessura (H) de biofilmes maduros de *Trichosporon* (48 h) em meio RPMI (barras pretas). RPMI suplementado com 10  $\times$  CIM AMB (barras brancas) e RPMI suplementado com 10  $\times$  CIM TIM96 (barras cinza). Os gráficos representam a intensidade colorimétrica das células vivas e mortas/danificadas coradas com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente.

## 8 DISCUSSÃO

Trichosporonose é uma doença fúngica invasiva, causada por espécies de *Trichosporon*, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. Colonização do trato respiratório ou gastrointestinal, precedem as infecções invasivas por *Trichosporon* spp. (WALSH et al., 2004). Essas infecções se relacionam de forma particular às enfermidades

hematológicas malignas, como linfomas e leucemias (GIRMENIA et al., 2005). Em pacientes acometidos por essas enfermidades, a tricosporonose costuma estar associada a um prognóstico ruim, com índices de mortalidade de até 80% (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008), sendo o uso de catéteres considerado uma porta de entrada para possíveis infecções, dado o fato que *Trichosporon* pertence à microbiota do hospedeiro (JUNIOR, et al., 2010; MICELI et al., 2011; CHO et al., 2015). Dentre os fatores de virulência dos fungos, destaca-se a capacidade de produção de biofilmes (DI BONAVENTURA et al., 2006). A capacidade que os microrganismos do gênero *Trichosporon* possuem de formar biofilmes é importante na relação parasita-hospedeiro e, consequentemente, no estabelecimento de processos infecciosos, uma vez que células em biofilmes possuem resistência a diversos antifúngicos, bem como possibilitam uma persistência do microrganismo no sítio infeccioso (DI BONAVENTURA et al., 2006; HASAN, et al., 2009; RAMAGE et al., 2012). Tendo em vista esses fatos, torna-se necessária a busca por novas alternativas de controle a essa problemática e, nessa perspectiva, este é um dos poucos estudos que investigaram o uso de um biossurfactante extraído de uma cepa de *B. subtilis* frente a células planctônicas e sésseis de espécies de *Trichosporon*.

A primeira etapa desse trabalho objetivou investigar o efeito do TIM96 frente células planctônicas de *Trichosporon* spp. *in vitro*. Para tanto, foi avaliado o efeito inibitório do surfactante sobre cepas clínicas de *T. asahii* e *T. inkin*. Foi constatado que o surfactante foi capaz de inibir em até 100% o crescimento visível para todos os isolados em concentrações que variaram de 78,125 a 312,5 µg/mL. Esse potencial antimicrobiano dos biossurfactantes já havia sido relatado na literatura científica. Em estudo conduzido por Saravanakumari & Mani (2010), foi relatado que biossurfactantes produzidos por *Lactococcus lactis* possuíam atividade antimicrobiana para patógenos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Em outro estudo, Rautela et al. (2014) realizaram uma microdiluição em caldo utilizando meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 16 M, pH 7.0, afim de determinar a CIM de um lipopeptídeo extraído de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*. Esse biossurfactante inibiu completamente o crescimento visível de cepas de *C. albicans* com valores de CIM que variaram de 2 a 4 mg/mL, superiores aos valores de CIM de TIM96 encontrados no presente estudo. Em outro estudo, Deepak & Jayapradha (2014) observaram a atividade inibitória de um biossurfactante lipopeptídico de uma cepa de *Bacillus thuringiensis* frente ao patógeno fúngico *Fusarium oxysporum*. Foram testadas concentrações do biossurfactante que variaram de 0,01 - 0,25 mg/mL, observando-se inibição do crescimento

das colônias fúngicas em concentrações  $\geq 0,05$  mg/mL. Rodrigues et al. (2006) reportaram um estudo onde observou-se a atividade antimicrobiana de dois biossurfactantes, sendo um extraído de *Lactococcus lactis* e outro de *Streptococcus thermophilus*, frente a uma variedade de bactérias e leveduras, como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Os resultados obtidos mostraram que para o biossurfactante de *L. lactis*, o CIM para *C. albicans* foi de 50 mg/mL e para *C. tropicalis* foi  $\geq 5$  mg/mL. Para o biossurfactante extraído de *S. thermophilus*, o resultado da CIM para *C. albicans* foi de 50 mg/mL e para *C. tropicalis* o CIM foi  $\geq 3$  mg/mL. Minif et al. (2015) conduziram um estudo onde foi avaliada a eficiência antifúngica de um biossurfactante lipopeptídico extraído de uma cepa de *B. subtilis* frente ao patógeno fúngico *Fusarium solani*. Para tanto, a atividade antifúngica foi mostrada por meio de um experimento de disco-difusão, onde concentrações que variaram de 0,1 a 3,0 mg/mL foram utilizadas. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de 3,0 mg/mL foi definida como a CIM, sendo capaz de inibir o crescimento fúngico.

Quanto a sensibilidade aos antifúngicos, foram utilizados AMB e os azólicos VCZ e FLC, sendo esses os dois azólicos mais comumente utilizados no tratamento das tricosporonoses invasivas, tomando por base a última década (LIAO et al., 2015). No presente estudo, AMB apresentou valores de CIM que variaram de 0,125 a 2  $\mu$ g/mL. Segundo Rodriguez-Tudela et al. (2005), cepas de *Trichosporon* spp. que apresentam CIM  $\geq 2$   $\mu$ g/mL para AMB seriam consideradas como cepas resistentes a este fármaco. A resistência de espécies de *Trichosporon* spp. à AMB é reportada na literatura, sendo *T. asahii* a espécie mais frequentemente relatada com esse fenótipo (WOLF et al., 2001; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; LIAO et al., 2015). No presente estudo, apenas uma das quatro cepas de *T. asahii* apresentou CIM = 2  $\mu$ g/mL. Quanto aos azólicos, FLC e VCZ apresentaram valores de CIM que variaram de 1 a 4  $\mu$ g/mL e 0,0312 a 0,125  $\mu$ g/mL, respectivamente. Como reportado na literatura, os azólicos apresentam uma maior eficácia frente a *Trichosporon* spp., sendo VCZ o composto mais eficiente em infecções experimentais em modelos animais, bem como em pacientes (WALSH et al., 2004a; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005; KALKANCI et al., 2010; LIAO et al., 2015).

No presente estudo, a atividade fungicida de TIM96 foi avaliada por meio de uma curva de morte. Neste experimento, AMB foi utilizada como controle positivo, uma vez que apresenta ação fungicida, causando a morte da célula fúngica por meio do extravasamento de íons (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002; ESPADA et al., 2008; OLIVEIRA, 2008). Os resultados revelaram que o declínio do número das colônias de *Trichosporon* ocorreu após 6 h de contato com o biossurfactante, com morte absoluta após 24 h. O experimento foi

conduzido em testes com concentrações que variavam de 78,125 a 625 µg/mL. Em relação a AMB, não foi encontrado um corte de tempo onde houvesse morte fúngica, mas um declínio a partir de 6 h após a incubação, exceto para uma cepa de *T. inkin* CEMM 05-6-075, onde esse declínio não foi observado. Ademais, ensaios de tempo de morte com biossurfactantes lipopeptídicos frente a cultivos de *Candida* já foram relatados na literatura. Em um desses estudos, células planctônicas de *C. albicans* foram incubadas na presença do surfactante em meio RPMI 1640, 0,16 M MOPS, pH 7.0, onde o tratamento dessas células com o biossurfactante em concentrações que variaram de 4 – 6 mg/mL durante 3 h, diminuíram as UFC/mL em mais de 90% (RAUTELA et al., 2014), demonstrando que esses biotensioativos são capazes de causar a morte de células fúngicas em concentrações superiores ao CIM. A hipótese é que essas moléculas biológicas agem na membrana plasmática, desestabilizando-a, causando extravasamento intracelular e consequente morte da célula fúngica (EEMAN et al., 2006; GRAU et al., 1999; RAUTELLA et al., 2014).

Com o objetivo de compreender o mecanismo de ação do TIM96 nas células fúngicas, foi investigado o efeito do biossurfactante sobre o conteúdo total de ergosterol celular e sobre a permeabilidade da membrana. De acordo com os resultados obtidos, TIM96 mostrou-se mais eficaz em reduzir o teor de esteróis totais em suas concentrações sub-inibitórias (CIM/2 e CIM/4), quando comparado ao FLC (CIM), em três das quatro cepas utilizadas no teste. Sendo o ergosterol o principal esteroide da membrana plasmática dos fungos, importante componente estrutural e regulador da fluidez da membrana (ZHANG; RAO et al., 2010), é importante que mais estudos sejam realizados afim de elucidar como o TIM96 reduz a quantidade de esteroide da membrana fúngica. Vale ressaltar que esse resultado explica o motivo pelo qual TIM96 apresentou atividade antagônica com FLC. Uma vez que ambas as drogas são capazes de reduzir o ergosterol da membrana fúngica, é capaz de ter acontecido uma competição pelos sítios ativos de ligação das mesmas, justificando o antagonismo encontrado no presente estudo.

Ademais, os resultados mostraram que TIM96 é capaz de alterar a integridade da membrana das células de *Trichosporon* spp. tornando-as mais permeáveis a moléculas como ácidos nucleicos e proteínas. A dispersão desses componentes intracelulares sugere que um dos efeitos do TIM96 sobre a célula fúngica seja a formação de poros na membrana, ou o rompimento da membrana citoplasmática, provocando morte celular. A liberação do conteúdo intracelular é considerada um forte indicativo de danos graves e irreversíveis (DEVI et al., 2010). Outros componentes presentes no surfactante TIM96 (surfactina, fengicina e iturina) também são capazes de interagir com a membrana plasmática. Surfactina é capaz de realizar

interações hidrofóbicas. Este composto penetra espontaneamente nas membranas lipídicas por meio dessas interações (EEMAN et al., 2006; GRAU et al., 1999). Já se sabe que o lipopeptídeo fengicina causa distúrbios na integridade da membrana citoplasmática, causando o aumento da permeabilidade e lise (BERNAT et al., 2016). Já iturina tem seu mecanismo de ação relacionado com a ruptura da membrana plasmática por meio da formação de pequenas vesículas (RODRIGUES et al., 2006). Quanto ao controle positivo de droga utilizada no teste, feniletilideno foi capaz de causar danos irreversíveis à membrana fúngica de *Trichosporon* spp., mesmo em concentrações subinibitórias. A capacidade dessa droga em causar dano à membrana fúngica já havia sido relatado por Cordeiro et al. (2014), que testaram seu efeito sobre o patógeno dimórfico *Histoplasma capsulatum*, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Dessa forma, o resultado obtido com TIM96 reforça a ideia de que biossurfactantes podem agir na membrana plasmática, o que explicaria sua atividade fungicida. Uma outra possível explicação para tal fenômeno seria a interação que os biossurfactantes promovem com a bicamada lipídica (BANAT et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar o potencial citotóxico de TIM96, células de macrófagos murinos 264.7 foram incubadas com o biossurfactante afim de se investigar quais concentrações do referido surfactante poderiam ser potencialmente tóxicas. Os resultados mostraram que todas as CIM utilizadas para as espécies de *Trichosporon* neste estudo foram tóxicas. Em um estudo conduzido por Deepak e Jayapradha (2014), foi realizado um ensaio de citotoxicidade com culturas de células HEP-2, com o intuito de se avaliar um biossurfactante lipopeptídico extraído de uma cepa de *B. thuringiensis*, utilizando-se para tanto o ensaio padrão MTT. Os resultados mostraram que mesmo em concentrações de 10XCIM o referido biossurfactante não apresentou comportamento tóxico para as células epiteliais humanas. Dessa forma, pode-se observar resultados discrepantes ao se utilizar ensaios com diferentes cultivos celulares. Nos resultados do presente estudo, o biossurfactante TIM96 apresentou comportamento citotóxico em concentrações a partir de 78,125 µg/mL, referente ao menor valor de CIM achado para *Trichosporon*. Os resultados do presente estudo apontam para a importância de outros ensaios de citotoxicidade, com outros cultivos celulares, afim de se elucidar o real poder citotóxico de TIM96.

Uma vez que células de *Trichosporon* spp. são intrinsecamente hidrofóbicas (DI BONAVENTURA et al., 2006; COLOMBO et al., 2011), cultivos planctônicos de espécies desse gênero foram avaliados quanto a alteração da hidrofobicidade de sua superfície após incubação com TIM96 e clorexidina, separadamente. Os resultados mostraram que concentrações subinibitórias de TIM96 foram capazes de diminuir a hidrofobicidade da

superfície celular, interferindo na interação célula-substrato, o que possivelmente impediria a formação de biofilmes. Dostalkova et al. (2015) demonstraram a influência do meio de cultivo na hidrofobicidade celular em *T. asahii*, concluindo que em meios quimicamente complexos, as células têm um comportamento mais hidrofóbico em relação às células cultivadas em meio mínimo. Assim, a hidrofobicidade tem uma correlação com a habilidade de adesão a superfícies, como já descrito para *Candida* (ANIL et al., 2001). Sendo assim, a próxima etapa foi investigar a capacidade do TIM96 em interagir com os biofilmes de espécies de *Trichosporon*.

A interação que as células planctônicas possuem com determinados substratos é determinante na formação do biofilme microbiano (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Para tanto, uma concentração determinada de  $10^6$  células/mL, foi utilizada como padrão para a formação do biofilme de *Trichosporon* spp. Essa concentração tem sido utilizada por alguns autores para ensaios de biofilmes fúngicos (DI BONAVENTURA et al., 2006; CORDEIRO et al., 2015). Inicialmente, biofilmes de *Trichosporon* spp. foram formados afim de se avaliar a máxima capacidade de formação das espécies em estudo. Os resultados dados em porcentagem da densidade ótica a 540 nm, demonstraram que essas espécies são ótimas formadoras de biofilme. Com base nesse resultado, esse trabalho avaliou diferentes etapas da formação do biofilme de *Trichosporon* spp.

Para tanto, analisou-se a princípio a capacidade que TIM96 e AMB apresentam de inibir o processo de adesão das células planctônicas ao substrato, o qual determina a primeira etapa de formação do biofilme (RAMAGE et al., 2012). Os resultados demonstraram que o biossurfactante TIM96 em concentrações 10xCIM foi capaz de interferir no processo de adesão dos biofilmes das espécies fúngicas em estudo. Esses resultados corroboram com estudos anteriores. Valraeds-Martine et al. (1996) verificaram a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por um biossurfactante produzido por *Lactobacillus*, sugerindo que biossurfactantes possuem a capacidade anti-adesiva. Cochis et al. (2012) avaliaram o potencial inibitório de 3 biossurfactantes provenientes de endófitos de *Robinia pseudoacacia* e *Nerium oleander* em concentrações que variaram de 78,1 – 312,5 µg/mL frente a biofilmes de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que todos os 3 biossurfactantes foram capazes de reduzir a formação do biofilme fúngico em concentrações que variaram de 78,1 – 156,3 µg/mL. Os resultados do estudo de Cochis et al. (2012) se assemelham aos achados para células planctônicas do presente estudo. Esses resultados abrem uma nova perspectiva quanto a novos ensaios com biofilmes de *Trichosporon*, com concentrações mais baixas, uma vez que a padronização deste estudo foi de 10XCIM de cada cepa. Em pesquisa conduzida

por Sriram et al. (2011) um biossurfactante lipopeptídico produzido por uma cepa de *B. cereus* foi capaz de inibir em até 57% a adesão de *S. epidermidis*. Machado et al. (2010) conduziram um estudo onde foram testadas 7 diferentes soluções de clorexidina a diferentes concentrações que variaram de 0,06 a 1 % frente a biofilmes de *Candida*. Os resultados demonstraram uma redução de células viáveis do biofilme de *Candida*, sugerindo que as células dos biofilmes expostas as diferentes concentrações de clorexidina foram destruídas.

Ademais, foi avaliada a capacidade que TIM96 desestabilizar o processo de formação dos biofilmes de *Trichosporon* nos tempos de 24 e 48 h, quando os biofilmes atingem a sua maior quantidade de biomassa (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; LATIFF et al., 2010). Os resultados desse estudo demonstraram uma inibição do processo de formação/amadurecimento dos biofilmes incubados com TIM96 em concentração 10xCIM, que mostrou ser eficaz frente aos biofilmes nos dois intervalos de tempo, uma vez que em relação ao controle positivo do teste, AMB em concentração 10xCIM, os resultados de inibição foram muito próximos. Isso demonstra que TIM96 além de possuir a capacidade de dispersar os biofilmes bacterianos, também possui a capacidade de dispersar o biofilme fúngico, assim como outrora já relatado na literatura para biossurfactantes lipopeptídicos (BANAT et al., 2014).

No tocante a análise dos biofilmes maduros, foi avaliada a capacidade de inibição dessas estruturas pelo biossurfactante TIM96 e AMB, isoladamente, em concentrações 10xCIM. Fenótipos de resistência a antifúngicos por biofilmes já são bastante documentados na literatura (DI BONAVENTURA et al., 2006; RAMAGE et al., 2012; ITURRIETA-GONZALEZ et al., 2014). Os biofilmes formados pelas cepas de *Trichosporon* spp. utilizadas neste estudo foram capazes de suportar concentrações 10XCIM de AMB, o que comprova que células em biofilmes conseguem ser mais resistentes que células planctônicas (RAMAGE et al., 2012), além de comprovar a resistência a fármacos antifúngicos em *Trichosporon* (DI BONAVENTURA et al., 2006; ITURRIETA-GONZALES et al., 2014). Quanto ao TIM96, os resultados mostraram que o composto é capaz de desestabilizar o biofilme fúngico. Esse resultado se deve provavelmente a sua natureza anfifílica capaz de interagir entre o substrato e o biofilme, destacando-o e interferindo na consolidação do biofilme naquele meio (BANAT et al., 2014).

A microscopia confocal revelou uma composição altamente heterogênea de estruturas fúngicas nos biofilmes maduros de *Trichosporon*, tais como blastoconídeos, hifas e pseudo-hifas. No entanto é importante notar que os biofilmes tratados com TIM96 apresentaram menos estruturas filamentosas que os controles. Isto é digno de nota, uma vez

que existe um maior nível de resistência das hifas a antimicrobianos e ao controle imunológico em relação aos conídios. Sendo os biossurfactantes considerados moléculas biológicas antimicrobianas, com excelente atividade anti-adesiva (BANAT et al., 2014), a microscopia confocal realizada no presente estudo mostrou que TIM96 comprovou e enfatizou seu efeito anti-adesivo contra biofilmes de *Trichosporon*. O resultado encontrado na presente pesquisa corrobora com estudos anteriores onde 3 biossurfactantes foram capazes de reduzir o biofilme de *C. albicans*, em concentrações que variaram de 78,1 – 312,5 µg/mL (COCHIS et al., 2012).

O presente estudo mostrou que TIM96 possui potencial antifúngico contra *Trichosporon* na forma planctônica, bem como em biofilme. Novas pesquisas devem ser conduzidas a fim de se avaliar o efeito antifúngico e anti-adesivo de TIM96 frente a outras espécies fúngicas. Estudos adicionais devem ser realizados para determinar quais os componentes químicos estão relacionados com a atividade antifúngica. Os resultados obtidos na presente pesquisa apontam para a importância de trabalhos de bio-prospecção de novos biossurfactantes que podem fornecer novas biomoléculas com novos e diversos mecanismos de ação antifúngica e anti-adesiva.

## 9 CONCLUSÕES

1. TIM96 foi capaz de inibir o crescimento fúngico *in vitro* de espécies de *Trichosporon* apresentando potencial antifúngico.
2. TIM96 foi capaz de provocar uma redução do teor de ergosterol total de espécies de *Trichosporon* em concentrações subinibitórias, além de induzir alterações na estrutura da membrana plasmática em concentrações também inibitórias. Isso permitiu o escape de macromoléculas importantes para o crescimento fúngico, como ácidos nucleicos e proteínas, causando danos irreversíveis à célula fúngica.
3. O composto apresentou atividade citotóxica em linhagens de macrófagos murinos.
4. TIM96 foi capaz de alterar a hidrofobicidade da superfície celular de espécies de *Trichosporon*
5. TIM96 foi capaz de inibir a adesão fúngica e consequente formação do biofilme de espécies de *Trichosporon*, diminuindo a sua viabilidade.
6. TIM96 foi capaz de interferir no processo de desenvolvimento e maturação do biofilme de espécies de *Trichosporon*, reduzindo a sua viabilidade bem como a sua biomassa.

## REFERÊNCIAS

- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 749–754, 2000.
- AHMAD, S.; AL-MAHMEED, M.; KHAN, Z. U. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 639–646, 2005.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 229–237, 2004.
- ANIL, S.; ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. **Oral Diseases**, v. 7, n. 2, p. 119–122, 2001.
- BANAT, I. M.; DE RIENZO, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915–9929, 2014.
- BENTUBO, H. B. L.; **Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.
- BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377, 2014.
- BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2002.
- BERNAT, P.; PARASZKIEWICZ, K.; SIEWIERA, P.; MORYL, M.; PŁAZA, G.; CHOJNIAK, J. Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 157, 2016.
- BISWAS, S. K.; WANG, L.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K. Molecular phylogenetics of the genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5171–5178, 2005.
- BORGHI, E.; SCIOTA, R.; BIASSONI, C.; CIRASOLA, D.; CAPPELLETTI, L.; VIZZINI, L.; BORACCHI, P.; MORACE, G. Cell surface hydrophobicity: A predictor of biofilm production in *Candida* isolates? **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 689–690, 2011.

- BUJDÁKOVÁ, H.; DIDIÁŠOVÁ, M.; DRAHOVSKÁ, H.; ČERNÁKOVÁ, L. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 3, p. 259–262, 2013.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262–266, 2004.
- CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203–206, 2003.
- CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF A. Patterns of amphotericin b killing kinetics against seven *Candida* species patterns of amphotericin b killing kinetics against seven *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2477–2482, 2004.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.
- CASERO, R. D.; COSTAS, M. G.; MENSO, E. *Trichosporon inkin* endocarditis: Short-Term Evolution and Clinical Report. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 396–397, 1996.
- CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121–132, 2008.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. HHS Public Access. **Microbiol Spectrum**, v. 3, n. 4, 2015.
- CHOW, B. D. W.; LINDEN, J. R.; BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 935–46, 2012.
- COCHIS, A.; FRACCHIA, L.; MARTINOTTI, M.G.; RIMONDINI, L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113, n. 6, p. 755–761, 2012.
- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1, p. 25–30, 2007.
- COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.
- COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408–412, 1981.
- CORDEIRO, R.A.; MARQUES, F.J.F.; CORDEIRO, R.A.; DA SILVA, M.R.; MALAQUIAS, A. D. M.; DE MELO, C. V. S.; MAFEZOLI, J.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; BRILHANTE,

R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; BANDEIRA, T.J.P.G.; SIDRIM, J.J.C. Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2504–2511, 2014.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F; DE MELO, C. V. S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; BANDEIRA, T.J.P.G.; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1277–1286, 2015.

DAVIES, G. E.; THORNTON, C. R. Differentiation of the emerging human pathogens *Trichosporon asahii* and *Trichosporon asteroides* from other pathogenic yeasts and moulds by using species-specific monoclonal antibodies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–18, 2016.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DEXTER, A. F.; MIDDELBERG, A. P. J. Peptides as functional surfactants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 17, p. 6391–6398, 2008.

DI BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; LEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **NIH Public Access**. v. 16, n. 6, p. 1–11, 2010.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 2012.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 7–10, 2002.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. L. G.; DOS SANTOS, F. B.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R. L-Dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 2, p. 988–981, 2014.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925.

**Medical Science Research**, v. 26, n. 3, p. 181–185, 1998.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAUER, S.; NICTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3689–3700, 2002.

FLEMING, R. V.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 915–933, 2002.

FONSECA, F. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; FISCHMAN-GOMPERTZ, O.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuroxilomannan. **NIH Public Access**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2009.

FORATTINI, O. P. Evolutionary epidemiological thought on infections. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 257–262, 2001.

FRANÇA, Í. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique, 3rd ed. **Wiley-Liss Inc.**, New York, 1994.

FUSARO, R. M.; MILLER, N. G. Onychomycosis caused by *Trichosporon beigelii* in the United States. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 747–749, 1984.

GÁCSER, A. STEHR, F.; KROGER, C.; KREDICS, L.; SCHAFER, W.; NOSANCHUK, J.D. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4710–4718, 2007.

GARCÍA-MARTOS, P.; DOMÍNGUEZ, I.; MARÍN, P.; GARCIA-AGUDO, R.; AOUI, S.; MIKRA, J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 19, n.6, p. 249–256, 2001.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; FANCI, R.; SPECCHIA, G.; MELILLO, L.; BUELLI, M.; PIZZARELLI, G.; VENDITTI, M.; MARTINO, P. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818–1828, 2005.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DÍEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5760–5767, 2001.

GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 366–371, 2002.

GUÉHO, E.; DE HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 4, p. 285–288, 1992.

HAMILTON, A. J.; GOMEZ, B. L. Melanins in fungal pathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 189–191, 2002.

HAN, M. H.; CHOI, J.H.; SUNG, K. J.; MOON, K. C.; KOH, J. K. Onychomycosis and *Trichosporon beigeli* in Korea. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 4, p. 266–269, 2000.

HANSAN, F; XESS, I; WANG, X; JAIN, N; FRIES, B C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **NIH Public Access**. v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.

HAZIROLAN, G.; CANTON, E.; SAHIN, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S. Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4841–4847, 2013.

HESLOP, O. D.; NYI, M. P. N.; ABBOTT, S. P.; RAINFORD, L. E.; CASTLE, D. M.; COARD, K. C. M. Disseminated trichosporonosis in a burn patient: Meningitis and cerebral abscess due to *Trichosporon asahii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4405–4408, 2011.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 8, p. 1182–1189, 2004.

HOY, J; HSU, K. C.; HOPFER, R. L; LUNA, M; BODEY, G. P. *Trichosporon beigeli* infection: a review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 959-967, 1986.

ICHIKAWA, T.; SUGITA, T.; WANG, L.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; NISHIKAWA, A. Phenotypic switching and B-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiol and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 237–42, 2004.

INÉS, M; DHOUHA, G. Lipopeptides biosurfactants, main classes and new insights for industrial; biomedical and environmental applications. **American peptide Society**, v. 104, n. 3, p. 129–147, 2015.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A.; PADOVAN, A. C. B.; BIZERRA, F. C.; HAHN, R. C.; COLOMBO, A. L. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

JAIN, A.; JAIN, S.; RAWAT, S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 314–320, 2010.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n.

3, p. 693–715, 2004.

KALKANCI, A.; SUGITA, T.; ARIKAN, S.; YUCESYOY, M.; ENER, B.; OTAG, F.; KIRAZ, N.; KUSTIMUR, S.; SANCAK, B.; EVCI, C.; EMEKTAS, G. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. **Medical mycology**, v. 48, n. 1, p. 141–146, 2010.

KÄMMERER, I.; RINGSEIS, R.; BIEMANN, R.; WEN, G.; & EDER, K. 13-hydroxy linoleic acid increases expression of the cholesterol transporters ABCA1, ABCG1 and SR-BI and stimulates apoA-I-dependent cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

KARASHIMA, R.; YAMAKAMI, Y.; YAMAGATA, E.; TOKIMATSU, I.; HIRAMATSU, K.; NASU, M. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 423–432, 2002.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

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, n. 8, p. 564–569, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135–1144, 2002.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731–1737, 1992.

KRCMERY JR, V.; MATEIČKA, F.; KUNOVÁ, A.; ŠPÁNIK, S.; GYARFÁŠ, J.; SYČOVÁ, Z.; TRUPL, J. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: Report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Supportive Care in Cancer**, v. 7, n. 1, p. 39–43, 1999.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. - **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 5. ed., 2011.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STHAL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 20, p. 6955–6959, 1985.

LEE, J. W.; MELCHER, G. A.; RINALDI, M. G.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigellii*. v. 28, n. 12, p. 2823–2827, 1990.

LI, H. M.; DU, H. T.; LIU, W.; WAN, Z.; LI, R. Y. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. **Mycopathologia**, v. 160, n. 3, p. 217–225, 2005.

LIAO, Y.; LU, X.; YANG, S.; LUO, Y.; CHEN, Q.; YANG, R. Epidemiology and outcome of *trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 141, 2015.

LIMA, L. B., **Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará**, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

LOISEAU, C.; SCHLUSSELHUBER, M.; BIGOT, R.; BERTAUX, J.; BERJEAUD, J. M.; VERDON, J. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5083–5093, 2015.

LYMAN, C. A.; DEVI, S. J. N.; NATHANSON, J.; FRASCH, C. E.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Detection and quantitation of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigelii* and implications for pathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 126–130, 1995.

MADARIAGA, M. G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5827–5829, 2003.

MAJUMDAR, S. S.; PADIGLIONE, A. A. Nosocomial infections in the intensive care unit. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 13, n. 5, p. 204–208, 2012.

MAKIMURA, K.; SUZUKI, T.; TAMURA, T.; IKEDO, M.; HANAZAWA, R.; TAKAHASHI, Y.; YAMADA, Y.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Comparative evaluation of standard dilution method and commercial kit for frozen plate antifungal susceptibility testing of yeasts using 200 clinical isolates. **Microbiol Immunology**, v. 48, n. 10, p. 747–753, 2004.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; DYMOCK, D.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 795–799, 1998.

MARINÉ, M.; BROWN, N. A.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; GOLDMAN, G. H. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 12–21, 2015.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

MCKENNEY, PT; EICHENBERGER, P. Dynamics of spores coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 245–260, 2012.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-

9, 2015.

MEKHA, N.; SUGITA, T.; IKEDA R.; NISHIKAWA, A.; AUTTHATEINCHAI, R.; POONWAN, N.; SAWANPANYALERT, P. Genotyping and antifungal drug susceptibility of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii* isolated from Thai patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 1, p. 67–70, 2010.

MERMEL, L. A.; FARR, B. M.; SHERERTZ, R. J.; RAAD, I. I.; O'GRADY, N.; HARRIS, J. S. CRAVEN, D. E. Guidelines for the management of intravascular catheter- related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1249–1272, 2001. MICELI, M. H.; DÍAZ, J.

A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011. MONTOYA, A. M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, A.; PALMA-

NICOLÁS, J. P.; GÓMEZ-TREVIÑO, A.; GONZÁLEZ, J. G.; GONZÁLEZ, G. M. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p. 505–511, 2015.

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, n. 1, p. 65–71, 2000.

MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drugs resistance in pathogenic fungi. p. 93-113. In: Kavanagh K. (Ed.), **Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques**. John Wiley & Sons, Ltd, USA. 2007.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; FUKUSHIMA, K.; SCHEREIBER, A. Z.; NISHIMURA, K.; PAPAIOUDANOU, P. M.; TRABASSO, P. TANAKA, P. MIYAJI, M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 39, n. 3, p. 161–164, 2001.

MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 2, p. 161–177, 2009.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1, p. 371–380, 2001.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1399–1412, 2012.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340–345, 2006.

NOSANCHUK, J. D.; GÓMEZ, B. L.; YOUNGCHIM, S.; DÍEZ, S.; AISEN, P.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. *Histoplasma*

*capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5124–5131, 2002.

NOSANCHUK, J. D.; VAN DUIN, D.; MANDAL, P.; AISEN, P.; LEGENDRE, A. M.; CASADEVALL, A. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 1, p. 187–193, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais - Avaliação de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biossurfactantes por *Bacillus*. **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, v. 6, p. 63-67, 2003.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PAOLO, W. F.; DADACHOVA, E.; MANDAL, P.; CASADEVALL, A.; SZANISZLO, P.; NOSANCHUK, J. D. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 55, 2006.

PAPHITOU, N. I.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J. H. In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1144–1146, 2002.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, v. 1, p. 1–6, 2010.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3–S13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419–4431, 2004.

POSTERARO, B.; TORELLI, R.; CAROLIS, E. D.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI, M. Antifungal susceptibility testing: Current role from the clinical laboratory perspective. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, 2014.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

- RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979–986, 2006.
- RAMOS, J. M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GUTIERREZ, F.; ELIA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Clinical case of endocarditis due to *Trichosporon inkin* and antifungal susceptibility profile of the organism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2341–2344, 2004.
- RAPARIA, K.; POWELL, S. Z.; CERNOCH, P.; TAKEI, H. Cerebral mycosis: 7-year retrospective series in a tertiary center. **Neuropathology**, v. 30, n. 3, p. 218–223, 2010.
- RIBEIRO, M. A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 4, p. 221–225, 2008.
- RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 8, p. 510–515, 2013.
- RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 5–24, 2008.
- RODRIGUES, L. R. BANAT, I. M.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 470–480, 2006.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; DIAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E.; CANO, V.; TAPIA, C.; PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4026–4034, 2005.
- ROMAN, A. D. E.; SALVAPA, E. M. T.; GUZMAN-PEPAMORA, M. A.; ROXAS, E. A.; LEYRITANA, K. T.; SANIEL, M. C. Invasive trichosporonosis in an AIDS patient: Case report and review of the literature. **International Journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 1, p. 70–75, 2013.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, 2011.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154–162, 1999.
- ROSHAN, A. S.; JANAKI, C.; PARVEEN, B. White piedra in a mother and daughter. **International Journal of Trichology**, v. 1, n. 2, p. 140–141, 2009.
- RUAN, S. Y.; CHIEN, J. Y.; HSUEH, P. R. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon*

*asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. e11-e17, 2009.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; SHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

SAUL, S. H.; KHACHATOORIAN, T.; POORSATTAR, A.; GEYER, S. J.; PASCULLE, A. W.; HO, M. Opportunistic *Trichosporon* pneumonia. Association with invasive aspergillosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 105, n. 9, p. 456-459, 1981.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; GRACEROSEPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 174-181, 2011.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 27-30, 2000.

SUZUKI, K.; NAKASE, K.; KYO, T.; KOHARA, T.; SUGAWARA, Y.; SHIBAZAKI, T.; OKA, K.; TSUKADA, T.; KATAYAMA, N. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, v. 84, n. 5, p. 441-447, 2010.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 2, p. 101-106, 1995.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A.K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KÖHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, 2010.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon* infection. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010.

VÁZQUEZ-GONZALEZ, D.; PERUSQUIA-ORTIZ, A. M.; HUNDEIKER, M.; BONIFAZ, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and

geotrichosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 5, p. 381-394, 2013.

WALSH, T. J.; NEWMAN, K. R.; MOODY, M.; WHARTON, R. C.; WADE, J. C. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. **Medicine**, v. 65, n. 4, p. 268, 1986.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 48-66, 2004a.

WOLF, D. G.; FALK, R.; HACHAM, M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; SALKIN, I. F.; POLACHECK, I. Multidrug-Resistant. *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4420-4425, 2001.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 36, n. 4, p. 223-228, 2003.

## ANEXO

### 1. MEIOS DE CULTURA

#### 1.1 Ágar Batata

Infusão de batatas\* 500mL Dextrose 10 g

Ágar bacteriológico 15 g

Água deionizada q.s.p 1000 mL

\*250g de batatas (*Solanum tuberosum*) cozidas em 500 mL de água por 1h, seguido de filtração em gaze e reconstituição do volume para 500 mL.

O meio de cultura foi preparado conforme as instruções do fabricante, fervidos para dissolução do ágar e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após isso, foram esfriados a 50°C e distribuídos em alíquotas de 4,0 mL em tubos de ensaio estéreis sob condições assépticas.

#### 1.2 Meio RPMI 1640

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio 10,4 g Água destilada q.s.p. 1000 mL

Adicionar lentamente o pó sob agitação em água destilada e ajustar o pH final para 7,0 utilizando-se solução MOPS com uma concentração final de 0,165 mol/L. Completar o volume com água destilada e filtrar em membrana milipore 0,22 µm, em bomba a vácuo.

### 2 Soluções

#### 2.1 Solução salina 0,9%

Cloreto de sódio – NaCl 0,90 g

Água destilada 100mL

#### 2.2 MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)

MOPS em pó 6,9 g

Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio.

### 2.3 Solução alcoólica de KOH 20%

Hidróxido de potássio – KOH em pó 7,89 g

Dissolver o KOH em 50 mL de álcool etílico 60%. Utilizar em seguida.

### 2.4 Tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 0,05% de Tween 20

Cloreto de sódio - NaCl

8 g Cloreto de potássio - KCl

0,2 g Fosfato de sódio dibásico - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,44 g Fosfato de potássio monobásico - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,24 g Água deionizada 800 mL

Tween 20 500 µL

Água destilada 1000 mL

Dissolver todos os sais em 800 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,4 utilizando solução de ácido clorídrico 1 mol/L e acrescentar 500 µL de Tween 20, em seguida completar para 1000 mL com água destilada.

### 2.5 Solução de Cristal Violeta 0,3%

Cristal violeta em pó 2g

Álcool etílico 95% 20 mL

Oxalato de amônio 0,8g

Água destilada 80 mL

Água destilada estéril 8,5 mL

Solução A: dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico 95%

Solução B: dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B para o preparo da solução-mãe de cristal violeta a 2%. Esterilizar por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Para o preparo de 10 mL da solução de cristal violeta a 0,3%, adicionar 1,5 mL da solução-mãe em 8,5 mL de água destilada estéril.

**2.6 Solução de Ácido Acético 33%**

Água deionizada 67mL

Ácido acético P.A. 33 mL

Adicionar 33 mL de ácido acético em 67 mL de água deionizada.

**2.7 Lactofenol azul-algodão**

Ácido láctico 20g

Fenol 20g

Glicerina 20g

Azul-algodão 0,05g

Água deionizada 20 mL