

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de β -Glucanases por Fungos Filamentosos e Avaliação da Atividade Antimicrobiana Frente à *Candida albicans*

Glauca Hollaender Braun¹, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro².

^{1,2} Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Depto de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP.

Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, CEP 14801-903, Araraquara- SP. E-mail: pietrorc@cfar.unesp.br

RESUMO

A resistência de micro-organismos aos fármacos atualmente utilizados no mercado é resultado de fatores como: mutações genéticas, intercâmbio de material genético, seleções evolutivas e proliferação de clones com múltiplas resistências, gerando um problema de saúde pública. Sendo metabolicamente versáteis, principalmente quanto à produção de enzimas e metabólitos secundários, os fungos filamentosos, despertam grande interesse por representarem uma opção biotecnológica aos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi produzir e determinar a atividade da enzima fúngica, β -glucanase, frente a células de *Candida albicans*. A β -glucanase extracelular foi obtida a partir de cultivo submerso de *Trichoderma reesei*. A atividade antimicrobiana foi analisada frente às células de *Candida albicans* para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados mostram CIM para a enzima produzida de 1,0 mg/mL enquanto para a enzima comercializada de 0,625 mg/mL. Os resultados contribuem em possíveis aplicações de produtos biotecnológicos, as enzimas fúngicas, na busca por novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: enzimas, β -glucanases, atividade antimicrobiana, resistência microbiana, produtos naturais

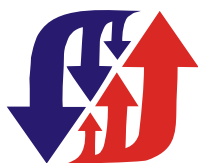
INTRODUÇÃO

A resistência aos fármacos antimicrobianos atualmente utilizados no mercado (LEVY, 2005), evidencia um grande problema na saúde pública, suscitando a importância do enfoque em pesquisas que abordem a prospecção de produtos naturais com atividade biológica para se descobrir agentes mais efetivos, menos tóxicos e com diferentes mecanismos de ação, além da correta utilização dos fármacos já disponíveis no mercado. (ANDERSON, 2005).

Dentre as importantes fontes naturais no desenvolvimento de novos fármacos, os microorganismos têm se destacado. Sendo metabolicamente versáteis, principalmente quanto a produção de metabólitos secundários, os microorganismos têm demonstrado resultados bastante promissores, produzindo diferentes componentes estruturais e um grande número de compostos biologicamente ativos (BUTLER et al., 2004; HAN et al., 2010).

Glucanases são enzimas com amplas aplicações biotecnológicas. São produzidas por fungos filamentosos e leveduriformes, e por bactérias, que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,3 presentes e β -D-glucanas, liberando glicose como produto principal (FLEURI; SATO, 2008).

A principal função estrutural das β -glucanas é auxiliar a manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras (SEVIOUR et al., 1992; STONE,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

CLARKE, 1992), e podem ser degradadas pelas β -glucanases (KUMAR; DEOBAGKAR, 1996) sendo estas, hidrolases que participam diretamente do processo de controle biológico, uma vez que hidrolisam β -1,3-1,6-glucanas constituintes da parede celular de alguns patógenos (IORIO et al., 2008).

As leveduras são fungos oportunistas que estão entre os agentes etiológicos mais comuns, causando infecções com diagnóstico e tratamento difíceis e com altos índices de mortalidade (PERLROTH ET al., 2007).

Candida albicans é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas, as quais em doentes imunocomprometidos podem ser fatais (LENGELER et al., 2000; SELITRENNIKOFF et al., 2001).

Assim como outros fungos, as espécies de *Candida* são organismos eucarióticos e possuem parede celular bem definida, composta por manoproteínas, β -1,3-D-glucanas, β -1,6-D-glucanas, quitina e uma pequena quantidade de proteínas e lipídios (AKPAN; MORGAN, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de β -glucanase produzida por fermentação ou adquirida comercialmente sobre o biofilme de *C. albicans*

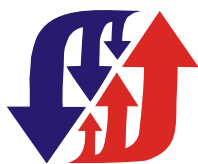
MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo dos Micro-organismos: Culturas dos fungos *Trichoderma reesei* (QM 9414) foram utilizados para a produção de glucanase. As cepas fúngicas foram mantidas em meio solidificado BDA (batata-dextrose-ágar) e submetidas a repiques periódicos a cada 30 dias. Para obtenção dos esporos 10 mL de água destilada estéril foram adicionados sobre os cultivos fúngicos por raspagem superficial das culturas obtendo suspensões de esporos (10^7 esporos/mL) para o inóculo. As enzimas β -glucanases foram obtidas por meio de cultivos em meio líquido segundo Rapp (1989), durante 6 dias, 150 rpm a 30 °C.

C. albicans foi cultivada em meio ágar Sabouraud e mantida em estufa a 35.5° C por 48h para o seu completo desenvolvimento. A manutenção da cepa foi realizada a partir de repiques quinzenais

Obtenção do extrato enzimático: o meio de cultura resultante proveniente da fermentação, após filtração para eliminar a biomassa, foi fracionado com sulfato de amônio e triturado em almofariz (DAWSON et al., 1969). Adicionou-se lentamente sulfato de amônio ao meio contendo a enzima até atingir o índice de saturação desejado e em seguida o extrato foi deixado em repouso “overnight” em geladeira e centrifugado por 20 min a 8000 rpm a 4 °C. Após, o precipitado foi suspenso em tampão adequado, dialisado sob agitação e refrigeração neste mesmo tampão. Ao final da diálise o extrato clarificado foi congelado e liofilizado.

Ensaio de atividade de β -Glucanase: 250 μ L de uma solução de laminarina (1%) dissolvida em 50 μ M de tampão de acetato pH 4,8 e 125 μ l da solução de enzima foram usadas para a reação. Depois de 30 min a 37 ° C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de reagente DNS. Esta mistura foi fervida durante cinco minutos e depois 5mL de água foram adicionados. O açúcar redutor formado foi detectado em leitura a 540 nm por um espectrofotômetro (Miller, 1995). Os brancos foram confeccionados da mesma maneira, excetuando que as enzimas foram previamente desnaturadas por fervura a 5 minutos.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Determinação da atividade antifúngica: os extratos enzimáticos obtidos foram liofilizados e posteriormente avaliados quanto à presença de atividade antimicrobiana frente ao fungo leveduriforme *C. albicans* de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008).

Em tubos tipo eppendorf foram preparadas soluções dos extratos, solubilizados em meio RPMI-1640. Para a obtenção de inóculos foram utilizadas culturas de 48 horas de *C. albicans*. As suspensões de *C. albicans* foram padronizadas na concentração de 2×10^4 células/mL. Como controle positivo utilizou-se Anfotericina B.

Em microplacas estéreis de 96 poços, realizaram-se diluições seriadas das amostras e dos controles, posteriormente acrescidas dos inóculos, totalizando um volume final de 200 μ L por poço para avaliação da atividade antifúngica. As microplacas foram seladas e incubadas a 35 °C por 48 horas. Definiu-se como CIM a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (QM 9414) cultivado em meio líquido submerso mostrou-se produtor de glucanase, nas condições de cultivo utilizadas.

O extrato liofilizado de β -Glucanase apresentou atividade biológica frente à *Candida albicans* na concentração de 1,00 mg/mL (Tabela 1).

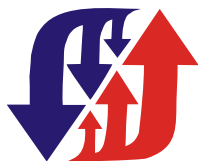
Tabela 1. Atividade antifúngica *in vitro* de enzimas β -glucanases frente a *C. albicans*

Amostras	CIM (mg/ml)
β -Glucanase produzida	1,00
β -Glucanase comercial (Sigma)	0,625
Controle positivo (Anfotericina B)	0,10
Controle negativo	-

Não permanecem ainda muito claros os mecanismos pelos quais a enzima exerce atividade antifúngica. β -Glucanase possui atividade auxiliar na produção de esferoplastos de *C. albicans* (DOMANSKI, MILLER, 1968). Possivelmente a camada de β -Glucana é destruída por ação da enzima, demonstrando assim capacidade antimicrobiana. Outros estudos (XU et al., 2013) demonstram que β -Glucanase podem induzir filamentação em *C. albicans*, indicando que a enzima pode atuar como um antifúngico natural que induz a modificações morfológicas nas quais ocorre rompimento das barreiras celulares.

CONCLUSÕES

Os resultados contribuem em possíveis aplicações de β -glucanases como produtos biotecnológicos na busca por novas alternativas farmacêuticas.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson JB. 2005. Evolution of Antifungal-Drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev* 3:547-555.
- Akpan, A.; Morgan, R. 2002. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 78: 455–459.
- Butler MS. 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J Nat Prod* 67: 2141-2153.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed., M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
- Dawson RMC, Elliot DC, Jones KM. 1986. Data for biochemical research (3rd ed.), Oxford Science Publications., 3rd.ed. Oxford: Oxford University Press, pp. 1-31.
- Domanski RE, Miller RE. 1968. Use of a chitinase complex and β -(1,3)-glucanase spheroplast production from *Candida albicans*. *J Bacteriol* 96:270-271.
- Fleuri LF, Sato HH. 2008. β -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciênc Agrotec* 32: 1224-1231.
- Han MJ, Kim NJ, Lee SY, Chang HC. 2010. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr Genet* 56: 369–382.
- Iorio E, Torantucci A, Bromuro C, Chiani P, Ferretti A, Giannini M, Cassone A, Podo F. 2008. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -D-(1,6)-glucan with β -D-(1,3)-side chains. *Carbohydr Res* 343: 105-1061.
- Kumar S, Sharma NS, Saharam MR, Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 40:1701–5.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Sousa C, Harashima T, Shen W, Wang P, Waugh M, Heitman J. 2000. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 746- 785.
- Levy SB. 2005. Antibiotic resistance- the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1446-1450.
- Miller GL.1995. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.
- Perlroth J; Choi B, Spellberg B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45: 321-346.
- Rapp PJ. 1989. 1,3- β -Glucanase, 1,6- β -Glucanase and β -Glucosidase Activities of *Sclerotium glaucum*: Synthesis and Properties . *J Gen Microbiol* 135: 2847-2858.
- Selitrennikoff CP, Alex L, Miller TK, Clemons KV, Simon MI, Stevens DA. 2001. Cos-1 a putative two-component histidine kinase of *Candida albicans*, is an in vivo virulence factor. *Med Mycol* 39:69–75.
- Seviour R, Stasinopoulos S, Auer D, Gibbs P. 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Crit Rev Biotech*, 12: 279-298.
- Stone B, Clarke A. 1992. Chemistry and Biology of (1,3) β - Glucans. La Trobe University Press, Melbourne.
- Xu H, Nobile CJ, Dongari-Batzoglu A. 2013. Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE* 8(5): e63736. doi:10.1371/journal.pone.0063736. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063736>.