

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica **das Ciências** **Biológicas e** **da Natureza 3**

Atena
Editora
Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof.^a Dr.^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr.^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 3) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-359-0 DOI 10.22533/at.ed.590192705 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série. CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE <i>Bothrops alternatus</i> (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL	
Benedito Matheus dos Santos Klaus Casaro Saturnino Vanderlúcia Fonseca de Paula Mirian Machado Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.5901927051	
CAPÍTULO 2	7
INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>SIDA RHOMBIFOLIA</i> L. (MALVACEAE)	
Rafael Lima Marinho Paiva Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Rayane Fernandes Pessoa Indyra Alencar Duarte Figueiredo Sarah Rebeca Dantas Ferreira Otemberg Souza Chaves Micaelly da Silva Oliveira Maria de Fátima Vanderlei de Souza Fabiana de Andrade Cavalcante	
DOI 10.22533/at.ed.5901927052	
CAPÍTULO 3	22
INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME (<i>Dioscorea alata</i>) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL	
Julia Mariano Caju de Oliveira Edilza Silva do Nascimento Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha	
DOI 10.22533/at.ed.5901927053	
CAPÍTULO 4	38
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.5901927054	
CAPÍTULO 5	50
MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS	
Odair Bufolo Daiane Silva Berdusco Freire Andréia de Fátima Selvati Bredariol	
DOI 10.22533/at.ed.5901927055	

CAPÍTULO 6 62

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

Taciani do Santos Bella de Jesus
Lucidio Cristovão Fardelone
Gustavo Paim Valença
José Roberto Nunhez
José Augusto Rosário Rodrigues
Paulo José Samenho Moran

DOI 10.22533/at.ed.5901927056

CAPÍTULO 7 72

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun
Henrique Pereira Ramos
Maria Laura Lucas Natal
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

DOI 10.22533/at.ed.5901927057

CAPÍTULO 8 80

PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Maria Cecília Bezerra Caldas
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.5901927058

CAPÍTULO 9 84

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂

Luis Eduardo Genaro
Luana Mafra Marti
Ana Carolina Bosco Mendes
Rafael Amorim Martins
Angela Cristina Cilense Zuanon

DOI 10.22533/at.ed.5901927059

CAPÍTULO 10 91

PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

Jaina Caroline Lunkes
Vanessa Cristina Arfelli
Jorge William Fischdick Bittencourt
Rafael Andrade Menolli
Alexandre Maller
Jose Luís da Conceição Silva
Rita de Cássia Garcia Simão
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.59019270510

CAPÍTULO 11 101

SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Luciana Furlaneto Maia
Naieli Mücke
Márcia Regina Terra
Danielle Karine Ohashi
Talita Butzske Bússolo
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.59019270511

CAPÍTULO 12 115

SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

Túlio Medeiros
José Agnelo Soares
Ronildo Otávio de Oliveira Neto
Juliana Targino Batista

DOI 10.22533/at.ed.59019270512

CAPÍTULO 13 127

STABILITY OF PECTINASE OF ASPERGILLUS NIGER IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.59019270513

CAPÍTULO 14 131

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENIDAS

Lívia Cordi
Nelson Durán

DOI 10.22533/at.ed.59019270514

CAPÍTULO 15 142

TEMPERATURE AND pH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

Jéssica de Araujo Zandoni
Eleni Gomes
Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

DOI 10.22533/at.ed.59019270515

CAPÍTULO 16 147

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva
Brenda Kischkel
Nicolle Ramos dos Santos
André Álvares Monge Neto

DOI 10.22533/at.ed.59019270516

CAPÍTULO 17 159

AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

Thayana Cruz de Souza
Anni Kelle Serrão de Lima
Michele Silva de Jesus
Raimundo Felipe da Cruz Filho
Wim Maurits Sylvain Degrave
Leila de Mendonça Lima
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.59019270517

CAPÍTULO 18 164

ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

Letícia Fernanda Bossa
Daniele Sartori

DOI 10.22533/at.ed.59019270518

CAPÍTULO 19 174

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gabriela Xavier Schneider
Jean Carlos Ramos de Almeida
Kassiely Zamarchi
Débora Santos
Danyelle Stringari
Renata Rodrigues Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270519

CAPÍTULO 20 188

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar
Andressa Sbrano da Silva
Lidiane Coelho Berbert
Vinícius Ribeiro Flores
João Victor Rego Ferreira
Alexander Machado Cardoso
Ida Carolina Neves Direito

DOI 10.22533/at.ed.59019270520

CAPÍTULO 21 199

REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTÁVEL

Gabriel Silva Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270521

CAPÍTULO 22	218
COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (LAURACEAE)	
Viviane Mallmann	
Lucas Wagner Ribeiro Aragão	
Edineia Messias Martins Bartieres	
Valdeci José Pestana	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
Rogério César de Lara da Silva	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Ana Francisca Gomes da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.59019270522	
CAPÍTULO 23	223
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270523	
CAPÍTULO 24	236
SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270524	
SOBRE O ORGANIZADOR	253

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

Henrique Pereira Ramos

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

Maria Laura Lucas Natal

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara- SP.

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. O surgimento de biofilmes de *Candida albicans* como uma forma de resistência microbiana pode ser observada em superfícies sólidas, como por exemplo, em próteses totais e aparelhos ortodônticos e as opções terapêuticas para sua redução e eliminação são escassas e muitas

vezes ineficientes. 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 em ensaios com células planctônicas CIM para a enzima produzida de 1,0 mg/mL e para ensaios com biofilme CIM de 1,0 mg/mL e IC_{50} de 0,785 mg/mL., enquanto para a enzima comercializada de 0,625 mg/mL e para anfotericina B de 0,010 mg/mL em ambos os ensaios. 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.

ABSTRACT: Antimicrobial resistance is an increasingly serious threat to global public health. Antimicrobial overuse, inappropriate prescribing, extensive agricultural use, and few

new antibiotics availability are the major factors that result in the rapid emergence of multidrug-resistant pathogens. *Candida albicans* biofilms formed in solids surfaces, such as dentures and orthodontic appliances, are associated with drastically enhanced resistance against most antimicrobial agents. In the last decades, biotechnology potential of filamentous fungi enzymes has attracted a great deal of attention for pharmaceutical applications. In this work, the enzyme β -glucanase was obtained from submerge culture of *Trichoderma reesei* and evaluated against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. MIC of β -glucanase were 1.0 mg/mL against planktonic cells and biofilms and IC₅₀ were 0.785 mg/mL against biofilms. These results contributed to biotechnology applications of enzymes in pharmaceutical industry for the search of potential candidates of new drugs.

KEYWORDS: enzymes, β -glucanases, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, biofilms, natural products

1 | INTRODUÇÃO

O crescente aumento da resistência aos fármacos antimicrobianos atualmente utilizados (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).

Historicamente produtos naturais têm relevante papel no desenvolvimento de novos fármacos. Dentre as importantes fontes naturais no desenvolvimento de novos fármacos, os microrganismos têm se destacado. Desde a descoberta da Penicilina por Fleming em 1928 um grande número de substâncias oriundas do metabolismo microbiano constitui alvos de interesse da indústria farmacêutica (BUTLER et al., 2004). Sendo metabolicamente versáteis, principalmente quanto à produção de enzimas e metabólitos secundários, os microrganismos têm demonstrado resultados bastante promissores, produzindo alta diversidade estrutural e um grande número de compostos biologicamente ativos (HAN et al., 2010).

As leveduras são fungos oportunistas que estão entre os agentes etiológicos mais comuns, causam infecções com diagnóstico e tratamento difíceis e com altos índices de mortalidade (PERLROTH ET al., 2007). Dentre as leveduras que acometem o ser humano, a *Candida albicans* é considerada uma das mais patogênicas, causando um grande número de infecções oportunistas que podem ser fatais principalmente para pacientes imunocomprometidos (LENGELER et al., 2000; SELITRENNIKOFF et al., 2001).

Assim como outros fungos, as espécies de *Candida* 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).

Na natureza os micro-organismos podem existir como células separadas (planctônicas), ou preferencialmente, na forma de comunidades microbianas estruturadas. Os biofilmes microbianos são definidos como comunidades estruturadas de micro-organismos irreversivelmente aderidas a uma superfície, artificial ou biológica, protegida por uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares (PIERCE et al., 2008) e que exibem um estado metabólico distinto ao observado no crescimento planctônico, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (LINDSAY; HOLY, 2006). Os microrganismos formam o biofilme como estratégia para otimizar sua sobrevivência, como uma forma adaptativa de perpetuação da espécie (MARSH, 2003), sendo constituídos por microrganismos de uma única ou de diversas espécies (COSTERTON et al., 1995). A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas, além de matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos (MUKHERJEE et al., 2005), relacionado também com má higiene oral (ALVES, 2009).

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, 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).

O uso de artefatos protéticos, como próteses totais e aparelhos ortodônticos, favorece a colonização e a consequente patogenicidade de leveduras na cavidade bucal. Embora as práticas adequadas de higiene oral desempenhem um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento do biofilme, produtos com agentes biocidas são particularmente úteis quando a higiene oral não é a ideal. (MARINHO et al., 2013). Neste contexto, avaliamos a ação de β -glucanases, produzida por fermentação e adquirida comercialmente, sobre o biofilme de *C. albicans*.

2 | MÉTODOS

2.1 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. A levedura *C. albicans* (ATCC 90028) 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

2.2 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 fluido de cultura 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.

2.3 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.

2.4 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).

2.4.1 Ensaio com células planctônicas

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.

2.4.2 Redução de biofilme de *C. albicans* em microplacas pelo método de XTT

As células de *C. albicans* foram previamente cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, a 37 °C, por 48 horas. Em seguida, as células recém-cultivadas foram transferidas para o meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e foram novamente incubadas a 37 °C, por 12-18 horas. Após esse período, preparou-se o inóculo através das suspensões de *C. albicans* padronizadas na concentração de 10⁷ cel/mL.

O biofilme de *C. albicans* foi formado em microplacas de cultura de 96 orifícios, alíquotas de 100 µL das suspensões padronizadas do micro-organismo foram transferidas para orifícios da placa de cultura e incubados por 90 minutos (fase de adesão), a 37 °C, em agitador orbital (75 rpm). Após esse período, os orifícios foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS. Em seguida, 150 µL do meio RPMI-1640 foram adicionados nos orifícios e mantidos por 48 horas, em agitador orbital (37 °C; 75 rpm), para desenvolvimento do biofilme.

Após a formação do biofilme, procedeu-se a duas lavagens com 150 µL de PBS para remoção de células não aderidas e posteriormente adicionou-se 200 µL das amostras, as quais foram avaliadas em diferentes concentrações. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido-tetrazólio (XTT) comparando-se os biofilmes tratados aos controle sem tratamento. Para este ensaio, as amostras avaliadas foram removidas e adicionou-se 200 µL da solução de XTT em cada orifício. As placas foram incubadas no escuro a 37°C por 3 h. Após esse período, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferida para uma placa de leitura, as quais foram lidas em espectrofotômetro em 490 nm e realizaram-se os cálculos de IC₅₀ das amostras testadas.

3 | 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 *C. albicans* na concentração de 1,00 mg/mL (Tabela 1) e apresentou IC₅₀ de 785 µg/mL quando testado em ensaio de redução de biofilme de *C. albicans* (Tabela 2).

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

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

Amostras	IC ₅₀ (μ g/mL)	CIM (mg/ml)
β -Glucanase produzida	785,0	1,00
β -Glucanase comercial (Sigma)	-	-
Controle positivo (anfotericina B)	3,310	0,10
Controle negativo	-	-

Tabela 2. Atividade de enzimas β -glucanases frente a biofilme de *C. albicans*

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.

4 | CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

- Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. 2009. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop** 42: 222-224.
- 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.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol** 49:711-745.

- 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.
- Lindsay D, von Holy A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **J Hosp Infect** 64:313–325.
- 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.
- Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. 2013. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 7:CD002279.
- Marsh PD. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology** 149: 279-94.
- Miller GL. 1995. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem** 31:426-428.
- Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. 2005. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol** 43: 191–208.
- Perlroth J; Choi B, Spellberg B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol** 45: 321-346.
- Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley Jr FL, Mowat E, Ramag G, et al. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols** 3:1494-1500.
- 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.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-359-0

