



**AVALIAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE LEVEDURAS PIGMENTADAS
QUANTO AO POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E EM MODELO
EXPERIMENTAL DE CANDIDÍASE VAGINAL**

MICHELLANGELO NUNES DA SILVA

Recife
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**AVALIAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE LEVEDURAS PIGMENTADAS
QUANTO AO POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E EM MODELO
EXPERIMENTAL DE CANDIDÍASE VAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração:

Micologia Aplicada

Fungos de Interesse Médico

Michellângelo Nunes da Silva

Orientadora

Dra. Rejane Pereira Neves.

Co-orientadora

Dra. Danielle P. Cerqueira de Macêdo.

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Michellangelo Nunes da

Avaliação de carotenóides de leveduras pigmentadas quanto ao potencial antifúngico *in vitro* e em modelo experimental de candidíase vaginal / Michellangelo Nunes da Silva- Recife: O Autor, 2015.

108 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Danielle P. Cerqueira de Macêdo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências e anexo

- 1. Candidíase 2. Produtos biológicos 3. Leveduras (fungos) I. Neves, Rejane Pereira (orientadora) II. Macêdo, Danielle P. Cerqueira (coorientadora) III. Título**

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-147

**AVALIAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE LEVEDURAS PIGMENTADAS
QUANTO AO POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E EM MODELO
EXPERIMENTAL DE CANDIDÍASE VAGINAL**

MICHELLANGELO NUNES DA SILVA

APROVADO em 23 / 02 / 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

COMISSÃO EXAMINADORA:

MEMBROS TITULARES

Dra. REJANE PEREIRA NEVES
Departamento de Micologia – CB/UFPE

Dra. JANAINA VERSIANI DOS ANJOS
Departamento de Química Fundamental – CCEN/UFPE

Dr. ALMIR GONÇALVES WANDERLEY
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCS/UFPE

MEMBROS SUPLENTE

Dr. REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

Dra. ANA MARIA RABELO DE CARVALHO PARAHYM
Centro de Biociências – UFPE

Dedico

*Ao meu maior amor, minha família.
Painho e Mainha, por todo o sacrifício para que eu pudesse chegar onde estou!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos momentos que pensei que não iria conseguir Ele junto a seus anjos estiveram ao meu lado escutando minhas orações. Agradeço por tamanha felicidade e por permitir que eu alcançasse mais este sonho, um novo passo na minha carreira profissional e, sobretudo humana.

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Esses anos de vivência foram fundamentais para que eu pudesse afirmar quem hoje verdadeiramente sou. Ao Departamento de Micologia e todos os funcionários, os quais se tornaram parte de mim durante todo esse período.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE pelo apoio financeiro durante esses vinte e quatro meses de pesquisa.

Ao meu maior amor, meus pais, Cláudia Ugiette & Marconi Nunes, por me aceitarem da forma que sou, com inúmeros defeitos, porém cheio de amor e qualidades. Não mediram esforços para que eu pudesse realizar este sonho, me oferecendo amor, carinho e umas boas palmadas. Assim cresci tendo uma vida cheia de oportunidades. Obrigado, essa conquista é nossa!

A minha irmã Susane Nunes que mesmo com tantas adversidades sempre acreditou em mim, incentivando, criticando e discutindo. Esteve firme comigo até nos finais de semana durante o experimental. Ao meu sobrinho Ayrton Matheus pelos momentos de desconcentração ao ter que parar e me dedicar a educá-lo nas tarefas do dia a dia. Vocês são parte da minha vida, deste sonho.

Aos meus avós, tios e primos, pelas orações, pensamentos positivos, e pelo carinho que a mim sempre foi dedicado. Confiam e torcem por mim, sempre!

A Profa. Dra. Rejane Pereira Neves pela sua confiança, ensinamentos, apoio e orientação ao longo desses anos que estamos juntos. Mesmo com ideologias e atitudes distintas tenho a certeza que toda essa vivência construtiva nos serviu e/ou serve como aprendizado e que iremos levar por toda a vida, muito obrigado por tudo.

A Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira de Macêdo por toda a colaboração e co-orientação, conselhos e apoio durante este período. Agradeço pela sua paz de espírito a qual me acolheu respeitosamente e me acalmou em tantos momentos de “quero desistir” ou “não vai dá certo”. Muito obrigado!

A Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães que assumiu o papel de mãe durante esses anos de “moradia” na Universidade. Obrigado pelos ensinamentos e

imprescindível alegria no dia a dia do Laboratório. Obrigado pelo acolhimento, respeito, compreensão, puxões de orelha, pelos potes de doce e por todo o seu amor.

A todos do Laboratório de Síntese Orgânica – DQF/UFPE, em especial a Profa. Dra. Janaína Versiani dos Anjos, seus ensinamentos e colaboração foram fundamentais na execução desse projeto. Obrigado pela confiança e, sobretudo, pelo respeito durante esses meses de convivência. Tenho orgulho e prazer em te conhecer, você é um exemplo de profissional e de ser humano.

Ao Prof. Almir Gonçalves Wanderley e todos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica do CCS/UFPE, obrigado pelo acolhimento e atenção durante o experimental.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE por algumas portas abertas no desenvolvimento desse trabalho. Em especial a Manuella Lins e Adriana Souza do LABIO e Júlia Campos do MALDI-TOF MS, muito obrigado por toda dedicação e apoio nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto e a Profa. Dra. Ana Maria Rabelo De Carvalho Parahym por ter aceitado fazer parte da banca avaliadora, além da colaboração, ensinamentos e compreensão na execução desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida, que de alguma forma ou de outra deixaram marcas e contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

“Quero trazer à memória só o que me pode dar esperança.”
Interpretado de Lamentações 3:21

RESUMO

Leveduras pigmentadas destacam-se nos processos biotecnológicos devido aos metabólitos produzidos com funções fisiológicas importantes, contribuindo com a resposta imune e tratamento de doenças. Assim, com o objetivo de detectar bioprodutos dessas leveduras e avaliar o potencial antifúngico foi desenvolvido além de técnicas *in vitro*, um modelo experimental de candidíase vaginal. Leveduras pigmentadas da Micoteca URM foram revisadas por critérios taxonômicos clássicos, moleculares e por espectrometria de massa. Testes de sensibilidade envolvendo o bioproduto de leveduras e antifúngicos comerciais foram realizados frente a isolados clínicos de *Candida albicans*. O isolado com menor concentração inibitória mínima foi selecionado para o modelo experimental. Fêmeas *Wistar* albinas, com peso médio de 230g, foram mantidas em temperatura controlada, umidade e fotoperíodo. A pre-disposição à infecção ocorreu por antibioticoterapia. A candidíase vaginal foi reproduzida através da inoculação de suspensão (10^6 UFC/mL) e *C. albicans* e após cinco dias foram tratadas com subproduto por via intravaginal. As leveduras pigmentadas foram autenticadas como *Rhodotorula mucilaginosa*. Entre outras substâncias, o ácido oleico foi produzido com destaque pelas leveduras, sobretudo no isolado URM 6683. Após os testes foi verificado a sensibilidade dos isolados de *C. albicans* tanto *in vitro* quanto no tratamento de candidíase vaginal. A aplicação de espécies de *Rhodotorula* na biotecnologia representa uma importante opção na promoção à saúde.

Palavras-chaves: Bioprodutos. Tratamento. Candidíase vaginal experimental. Biotecnologia.

ABSTRACT

Pigment include yeasts in biotechnology processes is due to metabolites produced with important physiological functions contributing to the immune response and treatment of diseases. Thus, in order to detect and evaluate byproducts of the yeast antifungal potential was developed in vitro techniques well as an experimental model of vaginal candidiasis. URM Culture Collection of pigmented yeasts were reviewed by classical taxonomic criteria, and molecular mass spectrometry. Sensitivity tests involving byproduct of yeast and commercial antifungal were performed against clinical isolates of *Candida albicans*. Isolated with lower minimum inhibitory concentration was selected for the experimental model. Albino Wistar rats, weighing 230g, were maintained under controlled temperature, humidity and photoperiod. The pre-disposition to the infection resulted from antibiotic therapy. Vaginal candidiasis is reproduced through the suspension for inoculation (10^6 CFU/mL) *C. albicans* and five days later were treated intravaginally byproduct. Pigmented yeasts were certified as *Rhodotorula mucilaginosa*. Among other substances, oleic acid was produced especially by yeasts, especially in isolated URM 6683. After testing it was found the sensitivity of the isolates of *C. albicans* both in vitro and in treatment vaginal candidiasis. The application of species of *Rhodotorula* biotechnology is an important option in health promotion.

Keywords: Bioproducts. Treatment. Experimental vaginal candidiasis. Biotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab – Anticorpo humoral

ÁOL – Ácido oleico

APCI – Pressão atmosférica ionização química

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CVV – Candidíase vulvovaginal

CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente

DBB – Diazonium Blue B

DMSO – Dimetisufóxido

FLC – Fluconazol

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IMC – Imunidade mediada por célula

ITS – Internal transcribed spacer

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LV – Linfócito vaginal

MOPS – [N-morfolino]propano-ácido sulfônico

MP – Manoproteína

NYS – Nistatina

PGE – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PMN – Polimorfonucleares

PRR – Receptores de reconhecimento padrões

RI – Recombinante inato

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SCO – Célula Single Oil

SI – Similaridade

SZ – Estreptozotocina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

URM – Micoteca da Universidade do Recife

VVM – Volume de ar / volume de meio / minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido oleico - $C_{18}H_{34}O_2$	33
Figura 2: Macroscopia de <i>Rhodotorula</i> sp. URM 6687; <i>Rhodotorula</i> sp. URM 7040 e <i>Rhodotorula</i> sp. URM 6683 com 72h de crescimento a 28°C em meio Sabouraud Dextrose ágar.	67
Figura 3: Figura 3: Microscopia da cultura de URM 6687 (A), URM 6683 (B) e URM 7040 (C); com 72 horas de crescimento em meio Sabouraud Dextrose Ágar, coradas com lactofenol azul de algodão.	68
Figura 4: Isolado URM 6683 de <i>Rhodotorula</i> : (A) Assimilação de fontes de carbono (G-galactose, D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L- lactose, S-sacarose, T-trealose); (B) nitrogênio (S-sulfato de amônio, N-nitrato de potássio) e (C) hidrólise de ureia positiva.	68
Figura 5: Picos espectrais obtidos de <i>R. mucilaginosa</i> URM 6683 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).	72
Figura 6: Picos espectrais obtidos de <i>R. mucilaginosa</i> URM 6687 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).	72
Figura 7: Picos espectrais obtidos de <i>R. mucilaginosa</i> URM 7040 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).	73
Figura 8: Biomassa das espécies de <i>Rhodotorula</i> adicionadas de dimetilsulfóxido em agitador magnético a 50°C. A) URM 6687, B) URM 6683 e C) URM 7040.	74
Figura 9: Separação da fase aquosa da extração dos componentes orgânicos das células de <i>Rhodotorula</i> sp.	74
Figura 10: Condições cromatográficas utilizadas para análise de lipídios e ácidos graxos.	76
Figura 11: Pico espectral identificando ácido decanóico, em isolado de <i>Rhodotorula</i> URM 6687.	77
Figura 12: Espectro referente ao ácido oleico obtido de <i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6683.	79
Figura 13: Espectrometria de massa evidenciando o pico 2 relativo oleato de etila, do isolado de <i>Rhodotorula</i> URM 7040.	80

- Figura 14:** Placa de microtitulação 96 poços utilizada no teste de susceptibilidade antifúngica de ácido oleico (1024-2µg/mL) frente a isolados clínicos de *Candida albicans*. 82
- Figura 15:** Retrocultivo (SDA 28°C/72h) dos isolados clínicos de *C. albicans* visivelmente sensíveis ao ácido oleico (1024-2 µg/mL). 83
- Figura 16:** Gaiolas com enriquecimento ambiental de tubos simples de papelão. 84
- Figura 17:** **A:** Células de leveduras ovais e hialinas aderidas às células epiteliais da mucosa vaginal. **B:** numerosas células de leveduras ovais e hialinas agrupadas em cachos. **C:** numerosas células de leveduras ovais e hialinas agrupadas com formação de hifas. 85
- Figura 18:** Colônias de leveduras obtidas do semeio do fluido vaginal em meio de cultura composto de ágar Sabouraud com 50 mg/L de cloranfenicol, incubadas a 28°C por até sete dias. 85
- Figura 19:** Exame direto dos fragmentos de tecidos da mucosa vaginal com várias células de leveduras ovais e hialinas aderidas ao tecido. **C:** células de leveduras desenvolvendo filamentos, típicos de *C. albicans*. 86
- Figura 20:** Macroscopia de *Candida* sp. em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos da mucosa vaginal. Colônias com bordas lisas; e coloração creme. 86
- Figura 21:** **A e B:** escamas epiteliais da mucosa vaginal livre de aderências e parasitismo. **C:** raras células de leveduras ovais e hialinas aderidas à escama epitelial caracterizando microbiota. 87
- Figura 22:** **A:** Prolapso vaginal em animal com candidíase vaginal. **B:** Animal tratado com ácido oleico, e mucosa vaginal restabelecida. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio das espécies de <i>Rhodotorula</i> .	69
Tabela 2. Crescimento de espécies de <i>Rhodotorula</i> em diferentes temperaturas	69
Tabela 3: Resultados fornecidos pelo programa computacional Bruker Daltonik Biotyper.	71
Tabela 4: Peso seco de cada espécie de <i>Rhodotorula</i> ;	73
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, nistatina, fluconazol e ácido oléico.	82
Tabela 6. Parâmetros monitorados após inoculação fúngica.	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 LEVEDURAS.....	19
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>Rhodotorula</i>	20
3.3 PRODUTOS OBTIDOS.....	22
3.4 CAROTENÓIDES.....	30
3.5 ÁCIDO OLEICO.....	32
3.6 O GÊNERO <i>Candida</i> E A CANDIDÍASE.....	35
3.7 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL.....	36
3.8 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM MODELO EXPERIMENTAL.....	43
3.9 TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL.....	49
4. MATERIAL E METÓDOS.....	59
4.1 REATIVAÇÃO AUTENTICAÇÃO DAS CULTURAS DE LEVEDURAS ESTOCADA NA MICOTECA URM.....	59
4.2 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS DAS LEVEDURAS PIGMENTADAS.....	62
4.3 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	63
4.4 MODELO EXPERIMENTAL.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS DE RHODOTORULA.....	67
5.2 BIOMASSA E EXTRAÇÃO.....	73
5.3 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> E EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	80
6. CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO.....	108

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga uma ampla diversidade de leveduras; as quais são fungos unicelulares ainda pouco conhecidos e explorados. O país agrega a maior biodiversidade do planeta, sendo a transformação de recursos naturais em bioprodutos algo alcançável e que deve ser estimulado. Neste contexto, as leveduras contribuem tanto para a estabilidade dos ecossistemas como para geração de insumos biotecnológicos que podem ser aplicadas à saúde (Landell; Silva, 2004; Moraes et al., 2005; Ruivo et al., 2006).

O aproveitamento desses fungos deve ser estimulado podendo ser realizado através do conhecimento de características fenotípicas, sobretudo de interesse industrial. Assim, tem sido impulsionada a utilização destes microrganismos com perspectivas para o desenvolvimento comercial. Tendências tecnológicas têm conduzido a aplicação dos fungos como potenciais produtores de compostos bioativos, a exemplo de pigmentos importantes, como os carotenóides e outros lipídios, constituindo uma das mais valiosas classes de compostos para aplicação nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica (Matsuoka et al., 2003).

A produção natural de ácidos graxos pela tecnologia microbiana utilizando leveduras pode ser justificada, considerando que os fungos com esta característica produzem vários tipos de lipídios, como β -caroteno e os ácidos graxos insaturados que são fisiologicamente significativos. Dentre estes fungos produtores destacam-se espécies de *Rhodotorula*, as quais pertencem ao grupo das leveduras basidiomicéticas, estando assim incluída a *R. glutinis* (Liang et al., 2009).

No Brasil, a exploração biotecnológica ainda encontra-se incipiente. A produção biotecnológica de bioprodutos vem ganhando notoriedade devido a determinados fatores, como possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; surgimento de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais, e controle das condições de cultivo (Silva, 2004).

Muitos microrganismos produzem esses metabolitos, no entanto nem todos são industrialmente interessantes, nesse contexto, as leveduras se destacam pelo seu uso como fonte de proteínas, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar, o bioproduto pode ser controlado e variar de acordo com as condições do

meio de cultura, temperatura, pH, luminosidade, dentre outros fatores (Valduga *et al.*, 2009).

Os benefícios desses bioprodutos, a exemplos dos ácidos graxos em relação à saúde, vão além de precursores vitamínicos. Estes, apresentam diversas funções fisiológicas, incluindo prevenção de determinados tipos de neoplasias, inibição de úlceras gástricas, prevenção à fotossensibilização em certas doenças de pele, aumento da resposta imunológica a alguns tipos de infecção e até proteção contra doenças degenerativas e cardiovasculares (Olson, 1999; Krinsky, 2001; Valduga *et al.*, 2009). Apesar da crescente incidência de casos de micoses em pacientes imunocompetentes e também imunossuprimidos, estudos aplicados à ação antifúngica destes bioprodutos são ainda bastante escassos (Cleff *et al.*, 2011).

Desta forma, pesquisas que vislumbrem avaliar o potencial das leveduras em produzir bioprodutos e aplicá-los no tratamento da candidíase, micose mundialmente mais frequente, devem ser estimuladas. Dentre os casos de candidíase, nas suas mais diversas manifestações clínicas, destaca-se a candidíase vulvovaginal, infecção fúngica da vulva e vagina, causada pelas várias espécies de *Candida*, comensais das mucosas vaginal e digestiva, que podem se tornar patogênicas, sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal (Fidel, 2002). Por outro lado, embora apresente uma alteração superficial na mucosa, esta levedurose pode evoluir e acometer outros sítios anatômicos, a depender da condição/estado geral do paciente (Macêdo *et al.*, 2010).

As reicidivas constantes e até mesmo a resposta terapêutica deficiente denotam a necessidade de pesquisas que busquem novas opções terapêuticas para o tratamento da candidíase vaginal considerada sexualmente transmissível, e bastante frequente em gestantes. Atualmente, a resposta ao tratamento não tem correspondido às expectativas necessárias devido à ocorrência de cepas multirresistentes às drogas comercialmente disponíveis (Menezes *et al.*, 2009). Assim, a caracterização de isolados de leveduras bioprodutoras e a aplicação de uma via microbiológica desse subproduto de interesse farmacêutico representam um avanço significativo na busca de tratamentos eficazes e menos tóxicos às pacientes acometidas pela candidíase vaginal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter bioprodutos de leveduras pigmentadas e avaliar o potencial antifúngico *in vitro* e em modelo experimental de candidíase vaginal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar leveduras de interesse biotecnológico mantidas na Coleção de Culturas Micoteca URM;
- Revisar leveduras de interesse biotecnológico quanto as características taxonômicas clássicas e moleculares;
- Isolar, quantificar e purificar bioprodutos das leveduras reativadas e revisadas;
- Determinar a concentração inibitória mínima de bioprodutos obtidos de levedura pigmentada, anfotericina B, nistatina e fluconazol (drogas-padrão “controle”) frente a isolados clínicos de *Candida albicans* através de teste de sensibilidade antifúngica *in vitro*;
- Selecionar um isolado clínico de *Candida albicans* quanto ao padrão de sensibilidade ao bioproduto e à droga controle;
- Avaliar *in vivo* o potencial antifúngico do bioproduto selecionado através de modelo experimental de candidíase vaginal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Eumycota, são seres unicelulares e que se reproduzem assexuadamente, de forma rápida, por brotamento ou fissão sem produção de esporos. Micromorfológicamente apresentam-se como células ovais ou esféricas, alongadas ou cilíndricas com brotamento simples ou múltiplo. Ainda podem ser apiculadas, elíticas, elipsóides ou até mesmo filamentosas, formando hifas e pseudomicélio, exibem dimorfismo, ou seja, podem se desenvolver tanto na forma de levedura quanto na forma de fungo filamentoso (Loguercio-Leite; Esposito, 2004; Alexopoulos et al., 1996).

As leveduras, apresentam uma nutrição quimio-heterotrófica absorptiva, predominantemente aeróbia, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C e pH de 4 a 7, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme ou filamentosa (Alexopoulos et al., 1996). Algumas espécies podem apresentar-se capsuladas. As células de levedura, em sua maioria, apresentam um tamanho de 4 a 8µm. Devido às condições ambientais, forma e tamanho das células podem variar de acordo com o estado fisiológico do microrganismo (Walker et al., 2002).

Aproximadamente 1500 espécies de leveduras foram descritas, sendo classificadas no grande filo Dycariomycota e distribuídos nos dois sub-filos, Ascomycotina e Basidiomycotina (Kurtzman e Fell, 2006; Satyanarayana; Kunze, 2010). Quanto ao seu habitat, esses microrganismos são cosmopolitas e estão amplamente distribuídos no meio ambiente, podendo ser obtidos do solo, animais, plantas, água, e do ar, bem como a microbiota normal do ser humano. Os Ascomycotina constituem um grupo com o maior número de espécies de fungos descritos. O sub-filo Basidiomycotina é composto, de modo geral, por fungos sapróbios, que vivem no habitat terrestre (Costa, 1992).

A identificação tradicional de leveduras é baseada em métodos que utilizam testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diversos carboidratos, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Kurtzman et al., 2011). Ainda, métodos moleculares são rápidos e úteis em análises filogenéticas, estão sendo utilizadas, permitindo o aumento do número e o surgimento de novas espécies.

No Brasil, a total biodiversidade de leveduras ainda é desconhecida para a ciência, no entanto existe um grande interesse industrial e biotecnológico sobre esses microrganismos (Ruivo et al., 2006; Moraes et al., 2005; Fuenteria, 2004; Buzzini e Martini, 2002; Manfio, 2000; Santos et al., 1996; Rosa et al., 1995). Estima-se a existência de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, sendo mencionadas como conhecidas apenas 5% da diversidade, sendo alguns gêneros ainda representados por poucas espécies, a exemplo do grupo *Rhodotorula* (Hawksworth, 2001).

3.2. CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *Rhodotorula*

O gênero *Rhodotorula* é um grupo bastante heterogêneo, composto por 38 espécies e pertence a classe Microbotryomycetes, ordem Sporidiobolales (Kirk, 2008; Barnett, 2000).

Em 1927, Harrison descreveu pela primeira vez o gênero *Rhodotorula*, o qual é facilmente identificado devido à produção de pigmento presente nas colônias. Esta pigmentação é característica do resultado da presença de carotenóides produzidos pela levedura para bloquear certos comprimentos de onda eletromagnética que seriam prejudiciais para a célula. A coloração da colônia pode variar de laranja/avermelhado a rosa ou até mesmo amarelo. A partir de 24h a 48h é possível a obtenção de colônias cuja temperatura ideal de crescimento está entre 25°C e 37°C de textura da colônia variando de lisa e/ou mucosa a rugosa (Almeida, 2005; Fell e Statzell-Tallman, 2000; De Hoog et al., 2000; Kwon-Chung e Benett, 1992).

A capacidade bioquímica e fisiológica das espécies de *Rhodotorula* apresenta baixa atividade fermentativa, sendo produtor de urease e outras enzimas com potenciais aplicações (Fell e Statzell-Tallman, 2000). Algumas características de *Rhodotorula* sp são compartilhados com o gênero *Cryptococcus*, como o crescimento, tamanho, forma da célula e habilidade de assimilar uréia. No entanto, difere-se na incapacidade do grupo *Rhodotorula* em assimilar inositol, fermentar açúcares além da pigmentação intensa característica (Kwon-Chung e Benett, 1992).

As espécies de *Rhodotorula*, apresentam na micromorfologia células ovais, esféricas ou alongadas com brotamento polar ou multilateral; presença, ou ausência, de hifa ou pseudomicélio (Almeida, 2005; Fell e Statzell-Tallman, 2000).

Estudos ambientais no Brasil comprovaram a presença de espécies de *Rhodotorula* através de isolamento a partir de frutas tropicais e suco de frutas, laticínios,

plantações de cana-de-açúcar, solo da Amazônia, água marítima de praias do Nordeste, escovas de dente e até em ambiente hospitalar (Trindade et al., 2002; Warren e Hazen, 1999; De Azeredo et al., 1998; Kwong-Chung e Bennett, 1992; De Barros et al., 1990; Mok et al., 1984). O isolamento destes microrganismos também foi descrito em diferentes ecossistemas, como nas profundezas do mar (Ekendahl et al., 2003), na Patagônia (Libkind et al., 2004), na Antártica (Pavlova, 2001), e no Mar Morto (Butinar et al., 2005).

Devido às características biotecnológicas das leveduras do gênero *Rhodotorula*, estudos estão sendo desenvolvidos para elucidação dos processos biotecnológicos que conduzam a máxima produção de carotenóides, como também a produção de outros lipídios a partir de isolados de *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* e *R. aurantiaca* (Akzu e Eren, 2005; Kaiser et al., 2007).

Descrita em 1928 por Harrison, *R. glutinis* é a espécie mais conhecida e prevalente nos isolamentos em diversos substratos, tornando-se de ampla distribuição. Apresenta colônias de coloração variando de rosa ao vermelho, aspecto mucoide; exhibe apenas reprodução assexuada por brotamento; sem hifas verdadeiras e formação de pseudomicélio (Barnett, 2000). No entanto, possui a capacidade de assimilar nitrato e produzir urease (Barnett, 2000; Freydiere et al., 2001; Warren e Hazen, 1999). Pertence à ordem Sporidobolales assim como *R. mucilaginosa*, portanto, para a autenticação taxonômica são necessárias técnicas moleculares, devido a alguns estudos relatarem a heterogeneidade genética e fisiológica de *R. glutinis* (Gadanhó e Sampaio, 2002; Sampaio et al., 2001; Vancanneyt et al., 1992; Hamamoto et al., 1987; Hamamoto et al., 1986¹; 1986²; Yamazaki e Komagata, 1981). Na saúde, esta espécie foi também descrita como causa de onicomioses em pacientes imunocomprometidos, fungemia em paciente com câncer, meningites em pacientes soropositivos e sepse (Shinde et al., 2008; Pulvirenti et al., 2010; Diktas et al., 2013; Altun et al., 2014; Menon et al., 2014).

A descrição de outra espécie *R. minuta* por Harrison ainda ocorreu em 1828, apresentando distribuição mundial e em vários substratos. As características das colônias em Sabouraud dextrose ágar a 25°C apresentam cor variando de amarela a tons vermelhados, textura fluida e mucoide; reprodução unicamente assexuada por brotamento; não apresentando hifas (Barnett, 2000). A microscopia, após 48h de incubação a 25°C no meio de cultura citado, desenvolve células de leveduras globosas e hialinas medindo de 3 a 6,5 µm de diâmetro (De Hoog et al., 2000; Kurtzman e Fell,

2000). A produção de urease ocorre como nas outras espécies de *Rhodotorula*. Não possui capacidade de assimilar nitrato e de crescer em meios de cultura contendo cicloheximida e ainda apresenta crescimento variável a 30°C. Esta espécie tem sido citada como capaz de causar endoftalmite, sepse conjunta, e sepse relacionada à catéter em paciente HIV positivo (Cutrona et al., 2002; Pinna et al., 2001; Goldani et al., 1995).

Em 1928 Harrison também descreve *R. mucilaginosa* a qual chamou inicialmente de *R. rubra* (Barnett, 2000; Benett, 1990). Na verdade, essa espécie possui varias sinonímias devido à variabilidade de suas cepas quanto a assimilação de carboidratos. Assim, o sequenciamento de nucleotídeos contribui para esclarecer as falhas na taxonomia (Fell e Statzell-Tallman, 1998). As colônias de *R. mucilaginosa* apresentam coloração que variam de creme a alaranjado e até tons de rosa; com textura rugosa e brilhante; reprodução unicamente assexuada por brotamento; podem apresentar uma simples pseudohifa ou hifa (Barnett, 2000). Após 72 horas de crescimento a 28°C, as células da levedura são globosas com dimensões variando de 2,5 a 10µm de diâmetro (Kurtzman e Fell, 2000). Possui capacidade de produzir urease, como as demais espécies do gênero. Contudo, não assimilam nitrato e não apresenta desenvolvimento em cicloheximida ou a 40°C. Esta espécie também já foi descrita causando infecção humana, sendo então relatada como causa de endocardite aórtica, fungemia e otomicose (Vennewald et al., 2010; Maeder et al., 2003; Kurtzman e Fell, 2000).

Em 1932, Lodder e colaboradores descreveu *R. aurantiaca*, a qual macroscopicamente apresenta colônias amarelas, rosa ao vermelho; de aspecto liso, mucoide e brilhante (Barnett, 2000). A melhor temperatura de crescimento é 25°C em meio ágar malte. Com células globosas ou ovóides, podendo ser também alongadas medindo entre 3 e 5µm. Assimila nitrato e nitrito e também produz urease (Barnett, 2000; Kurtzman e Fell, 2000). Nessa espécie é comum a reprodução assexuada por brotamento multilateral e pseudohifa (Kurtzman e Fell, 2011; Chang, 2002; Barnett, 2000; Fell e Statzell-Tallman, 2000).

3.3. PRODUTOS OBTIDOS

Os fungos, a depender da espécie podem sintetizar lipídios, tendo neste sentido o gênero *Rhodotorula* o acúmulo de aproximadamente 60% de lipídios em sua massa celular, assim sendo considerada uma levedura oleaginosa (Dai et al., 2007). A alta concentração de lipídios ocorre na ausência de fontes de nitrogênio e no excesso de

carbono em meios de cultura, situação que induz o organismo a uma fase estacionária então o carbono excessivo é canalizado para os lipídios (Ratledg, 1988).

Os estudos com leveduras oleaginosas teve maior expressão à partir da década de 70. Desde então mais atenção tem sido dada aos estudos com algumas espécies de leveduras (Rossi, et al., 2011; Schneider et al., 2013). Espécies de leveduras a exemplo de *Cryptococcus toruloides*, *C. curvatus*, *Lypomices lipofera*, *L. starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon pululans*, *T. fermentans*, *Yarrowia lipolytica* e *Pichia guilliermondii*, bem como *Rhodotorula glutinis* e *R. mucilaginosa*. Tais leveduras têm sido citadas como capazes de acumular mais de 25% de lipídios em seu peso seco (Beopoulos et al., 2009; Zhao et al., 2010).

Outra levedura considerada oleaginosa é o *Trichosporon capitatum*, que chega a acumular lipídios com cerca de 80% de ácido oléico e 89% do seu conteúdo total de ácidos graxos insaturados em meio líquido com limitação de nitrogênio. Otimização dos meios de comunicação resultou em um aumento de 61% no rendimento lipídico de *T. capitatum* após cultivo a 28°C e 160rpm durante 6 dias. Nos processos industriais essa levedura pode ser de uma linhagem promissora para a produção de biodiesel de alta qualidade (Wu et al. 2011).

Na biotecnologia, as leveduras ainda têm sido intensamente avaliadas quanto a produção de carotenóides, os quais são amplamente utilizados na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêuticas, entre outras aplicações; porém o aumento da produção de carotenóides enfrenta limitações e dificuldades devido à adequação e condições de fermentação das cepas (Bhosale e Gadre, 2002; Aksu e Eren, 2005; Yen e Liu, 2014). Assim, a extração de carotenóides e sua otimização tem sido alvo de pesquisas avaliando vários fatores, estes relacionados à composição de meio de cultura, temperatura, aeração, adição de íons minerais e demais nutrientes que favorecem o aumento da produção do pigmento por leveduras (Akzu e Eren, 2005; Maldonade, 2008; Park et al., 2007).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são amplamente utilizadas na fermentação devido a sua natureza unicelular e as altas taxas de crescimento, sendo capaz de produzir β -caroteno e torularodeno como produtos finais do seu metabolismo (Costa et al., 1987; Kaiser et al., 2007).

Kim et al., (2011) realizaram estudos com isolados de *R. aurantiaca* visando aperfeiçoar a produção de carotenóides. Assim diferentes fatores como pH, temperatura

e concentrações de glicose, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio foram avaliados a fim de verificar seus efeitos no aumento da produção de biomassa e consequentemente de carotenóides. Diferentes condições de cultura foram previstas para maximizar as variáveis de resposta, indicando que não existe uma correlação direta entre o crescimento celular e produção de carotenóides.

Os estudos de Easterling et al. (2009) comprovaram que *R. glutinis* acumula cerca de 38% da biomassa em lipídios quando cultivado utilizando o glicerol como substrato. Ainda verificando que ácido graxo esteárico mostrou-se presente em maior quantidade dos lipídios produzidos. Segundo Saenge et al., (2011), a produção de carotenóides e lipídios pode ser melhorada a partir de crescimento em biorreator agitado com pH 6,0 e taxa de aeração controlada em 2vvm.

Li et al. (2010), realizaram um estudo com *R. mucilaginosa* isolada de peixes marinhos, cultivada em meios contendo amido de mandioca. O isolado apresentou 47,9% de lipídios em suas células, entres os encontrados destacaram-se, os ácidos graxos: ácido palmítico e ácido esteárico.

Nos estudos de Akzu e Eren (2005) foram verificadas que para produção de carotenóides as condições ideais a partir de *R. mucilaginosa* foram pH 7,0 e temperatura de 30°C. O rendimento da produção e a concentração dos carotenóides totais foram significativamente aumentados com a taxa de aeração até 2,4vvm. A adição de sulfato de amônio garantiu o máximo de produção de carotenóides. As fontes de carbono utilizadas nesse estudo foram glicose, sacarose, lactose. Os autores concluíram que o aumento na concentração de açúcar eleva a taxa de crescimento da levedura e a produção total de carotenóides.

Akzu e Eren (2007) estudaram a produção de carotenóides por *R. glutinis* e consideraram que as melhores condições para obtenção foi pH 6,0 e temperatura de 30°C. A concentração mais elevada de carotenóides (125mg de carotenóides totais por litro de caldo de fermentação) foi obtida quando 20g/L de melaço de sacarose foi usada como fonte de carbono.

Weber et al. (2007) descreveram um método simples de extração de pigmentos carotenóides a partir de células de leveduras congeladas e sua análise por HPLC fase-reversa utilizando uma coluna C₁₈ e uma fase líquida com solvente de acetona/água para a separação de β -caroteno e astaxantina, a identificação foi confirmada por

espectrometria de massa APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica) utilizando condições cromatográficas similares.

Kaiser et al. (2007) investigaram um método para quantificação de carotenóides produzidos por bactérias e fungos em pequena escala. Os autores utilizaram técnicas enzimáticas para a desintegração das células, tratamentos mecânicos como ultra-som, congelamento/descongelamento e tratamentos químicos com dimetilsufóxido. No processo de extração utilizaram metanol e clorofórmio misturado, em seguida hidroxitolueno butilado e alfa-tocoferol. Os compostos foram separados com HPLC de fase reversa com C₃₀. Concluíram que esse método é sensível para a determinação de carotenóides a partir de bactérias e leveduras.

Schneider et al. (2013) investigaram a produção de lipídios e carotenóides por *R. glutinis* cultivadas em efluentes residuais de cerveja. Obtiveram um teor de carotenóides totais entre 0,6 e 1,2mg/L. Contudo as condições de cultivo foram inadequadas como fontes de carbono (maltose), pH, aeração, uma vez que o controle dessas condições contribuem no crescimento celular, bem como a formação de lipídios e carotenóides. No entanto, efluentes de cervejaria pode ser considerado um bom substrato para a produção microbiana de lipídeos e simultaneamente de carotenóides e deve ser objeto de uma investigação mais aprofundada.

Marova et al., (2012) estudando o uso de vários substratos para a produção de biomassa de *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, verificaram os maiores rendimentos em *R. glutinis* cultivadas em meio de soro de leite a partir do qual obteve 45g/L de biomassa contendo 46mg/L de β -caroteno. No entanto, *R. mucilaginosa* crescida em meio de batata adicionado 5% de sal produziu 30g/L de biomassa contendo por 56mg/L de β -caroteno. Segundo os autores, a biomassa seca de leveduras vermelhas enriquecidas em carotenóides poderia ser usada diretamente na indústria de alimentação como suplemento nutricional.

Maldonade et al., (2008) estudaram a composição dos carotenóides de leveduras isoladas de ecossistema brasileiro. Os isolados foram cultivados em meio de cultura contendo extrato de malte e levedura sob agitação de 200rpm a 25°C durante 5 dias, sem iluminação. Em *R. glutinis* e outras espécies como *R. graminis* predominou β -caroteno com rendimento, enquanto toruleno foi o principal carotenóide em *R. mucilaginosa*. *R. glutinis* teve a mais alta produção de carotenóides totais (881 μ g/L), seguido por *R.*

graminis (594µg/L). *R. minuta* apresentou 168 µg/L de carotenóides totais, sendo a mais baixa concentração nesse estudo.

Em estudo realizado na China por Zhang et al. (2014) foi avaliada a capacidade de produção de lipídios e de carotenóides por *R. glutinis* sob diferentes condições de exposição a luz e temperaturas. Após a obtenção dos dados, os autores concluíram que ausência de luminosidade e baixa temperatura poderia aumentar o teor de lipídios, enquanto luz/alta temperatura aumentou os rendimentos de biomassa e carotenóides. Na primeira etapa, a biomassa máxima alcançada foi de 28,1g/L sob luz e alta temperatura. Em seguida, a condição de incubação foi alterada para baixa temperatura e escuro, onde foi obtido 86,2g/L de biomassa. Os principais carotenóides identificados por HPLC foi o β -caroteno (68,4%), torularrodina (21,5%) e toruleno (10,1%).

Irazusta et al. (2013) estudaram a produção de carotenóides a partir do estresse oxidativo de *R. mucilaginosa*. A exposição por uma sobrecarga de cobre (Cu) aumenta a biossíntese de carotenóides nesta levedura, modificando ao mesmo tempo a proporção relativa dos pigmentos produzidos. A exposição a H₂O₂, um agente de stress oxidativo, isolado ou em combinação com cobre (Cu) também alterou o teor de carotenóides, tanto qualitativa como quantitativamente. A alteração da proporção relativa dos carotenóides torularrodina, toruleno e β -caroteno, bem como a detecção de γ -caroteno na presença de H₂O₂ e Cu permitiu aumentar a hipótese de que os carotenóides produzidos por *R. mucilaginosa* desempenha diferenças na resposta ao estresse oxidativo da levedura.

Park et al. (2007) estudaram diferentes solventes para a ruptura química de células de *R. glutinis* para o isolamento de pigmentos carotenóides. As leveduras foram cultivadas em 100 mL de meio de cultura contendo extrato de levedura e malte, sob agitação de 300 rpm a 22 °C durante 48 h. A partir de células liofilizadas utilizaram cinco solventes (dimetilsulfóxido, éter, clorofórmio, hexano e acetona) diferentes e, assim, libertar os carotenóides produzidos intracelularmente. A análise cromatográfica identificou que três pigmentos carotenóides (β -caroteno, toruleno e torularrodina) estiveram presentes no extrato. Os resultados deste estudo mostraram que, quando os solventes foram utilizados em conjunto demonstraram um efeito sinérgico na recuperação de carotenóides. Os três solventes testados, dimetilsulfóxido, éter de petróleo, e acetona, foram significantes para a extração de carotenóides. Os autores concluíram que os resultados sugerem estudos adicionais sobre o uso de misturas de solventes para isolar pigmentos carotenóides a partir de leveduras.

Hernandez-Almanza et al. (2014) sabendo que várias cepas de *R. glutinis* apresentam características importantes como a produção de grandes quantidades de carotenóides, fizeram uma revisão sobre temas que discutem a biologia e biotecnologia da levedura, sua fisiologia e rotas bioquímicas, bem como sistemas de fermentação para a produção industrial de pigmentos comercialmente viáveis. Concluíram que *R. glutinis* apresenta vantagens para sintetizar lipídios, carotenóides, enzimas, entre outros compostos, portanto, tem grande importância industrial que deve ser explorada.

Passos et al. (2007) analisaram comparativamente a eficiência de três métodos de extração de carotenóides totais e astaxantina de microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*) e da levedura *Phaffia rhodozyma*. Dentre as biomassas estudadas, a microalga *H. pluvialis* revelou o maior conteúdo de carotenóides totais (20,79 mg de carotenóides totais/g célula seca), enquanto a levedura *P. rhodozyma*, apesar de um menor conteúdo de pigmentos totais (0,22 mg/g célula seca), apresentou a maior relação entre a concentração de astaxantina livre e o conteúdo de carotenóides totais (cerca de 87,5% dos carotenóides presentes como astaxantina livre), quando comparada aos outros microrganismos (*C. vulgaris*, 13,4%; *H. pluvialis*, 4,7%). A utilização de dimetilsulfóxido como solvente revelou ser a melhor estratégia para a extração dos carotenóides entre os métodos estudados.

Zhekisheva et al. (2002) estudaram o acúmulo de ácido oléico em *Haematococcus pluvialis* sob condições de estresse, correlacionando com os ésteres de astaxantina. Em qualquer inanição de azoto ou de luz elevada, a produção de astaxantina foi acompanhada. Em todos os casos, os ácidos gordos recém-formados, que consistem até 34% de ácido oléico. Além disso, o reforço da acumulação de ácido oléico foi linearmente correlacionado com a de astaxantina.

Razavi e Blanchard (2006) investigaram a identificação e separação dos carotenóides produzidos por *Sporobolomyces ruberrimus* H110 através da criação de um método analítico baseado em UV-HPLC/ APCI-MS. Nesse experimento houve a identificação de astaxantina, cantaxantina, torularrodina e β -caroteno. Sendo que a produção essencial de torularrodina é abundantemente por esta cepa.

Yen e Liu (2014) estudaram a aplicação de um biorreator para o de *R. glutinis* com diferenças de aeração. Neste estudo, o funcionamento de um fermentador “airlift” foi examinado para o cultivo de *R. glutinis*. A concentração máxima de biomassa de 25,40g/L foi observada no lote com uma taxa de aeração de 2,0vvm, sendo confirmando

que o uso de uma alta taxa de aeração melhora o crescimento celular. Nessa pesquisa foi demonstrado que o uso do biorreator tem como vantagem uma operação simples e de baixo consumo de energia.

Libkind e Broock (2006) objetivaram a produção de carotenoide por leveduras nativas da Patagônia a partir da biomassa. Foram utilizados como fonte de nitrogênio, em meio semi-sintético, sulfato de amônia e uréia e subprodutos agroindustriais (melaço de cana, xarope de milho, extrato de malte) como fontes de carbono. Foram isoladas 15 cepas e a produção máxima de carotenóides totais foi por *R. mucilaginosa* CRUB 0195 que chegou a atingir 153µg/g em meio extrato de malte, seguido por meio xarope de milho com 156µg/g e meio de melaço de cana com 68µg/g. Entretanto, culturas obtidas de *Cryptococcus* produziram menos quantidade de carotenóides totais (35µg/g) nos três meios testados. β-caroteno, toruleno e torularrodina foram os principais carotenóides identificados nesse trabalho.

Os estudos de Yang et al. (2011) sobre a produção de astaxantina por *P. rhodozyma* tendo resíduos da mandioca como substrato identificou os efeitos da fonte de carbono, o pH inicial e o conteúdo de azoto para o rendimento de astaxantina com intuito de otimizar as condições de fermentação para produção. As condições ótimas foram teor de açúcar de 40g/L, um pH inicial em torno de 4,0 e um teor de nitrogênio de 8g/L. Assim, esse estudo mostra que o resíduo de mandioca é um bom substrato para a produção da astaxantina por *P. rhodozyma*. O rendimento de astaxantina sob a condição ideal foi de até 2,98mg/L.

Ungureanu et al., (2013) apresentaram um método de extração por partição centrífuga na recuperação direta de metabólitos de *R. rubra* a partir de caldo de cultura. Torularrodina foi extraída a partir de células de *R. rubra* ICCF 209 por extração por partição centrífuga. Nesse estudo, a recuperação da torularrodina atingiu 74µg/g de biomassa, equivalente a 294µg/L de meio de cultura. Os resultados mostraram o potencial desta técnica de extração de carotenóides. A cultura em caldo foi utilizada como a fase de transporte, com o consumo de solvente moderado e curto tempo de extração.

Chociai et al. (2002) estudando a produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*, observaram que a produção pode ser eficiente quando cultivada em meio de cultura de baixo custo, à base de caldo de cana diluído 1:10 e uréia a 1g/L. No entanto, a produção de biomassa e a formação do carotenoide sofrem a inibição pelo substrato,

limitando desta forma a utilização do caldo de cana com concentrações da fonte de carbono superior a 20g/L, importante consideração na produção industrial de astaxantina. Nesse estudo foi possível aumentar a produtividade do processo em 84%, comparando ao cultivo controle.

Malisorn e Suntornsuk (2008) buscando aperfeiçoar a produção de β -caroteno pelo isolado DM28 *R. glutinis* utilizaram fermentado, rico em lipases, de rabanete e salmoura em um reator sob agitação com 30 g/L de sólidos solúveis de fermentado rabanete salmoura como único substrato. As condições ideais para a produção de β -caroteno foi a 30 °C, pH 6 e 80% de oxigênio dissolvido. Nessas condições, *R. glutinis* produziu 2,7 g/L de biomassa e 20 μ g/L após 24 h de fermentação o máximo de β -caroteno. Malisorn e Suntornsuk, em 2009, estudaram a produção de β -caroteno por DM28 *R. glutinis* através de cultivo contínuo. Foi realizada uma cinética de fermentação e crescimento de DM28 *R. glutinis* usando fermentado de resíduos gerados pela indústria. A concentração adequada do resíduo para a produção de β -caroteno foi de 30g/L. Os autores observaram que a taxa de crescimento da produtividade de β -caroteno por esse isolado em fermentado rabanete salmoura é melhor obtido por cultivo contínuo.

Saenge et al., (2011) visando conhecer o potencial da levedura TISTR 5159 *Rhodotorula glutinis*, estudaram a bioconversão de lipídios e carotenóides. A adição de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e Tween 20 como tensioativo aumentou o acúmulo de lipídios e carotenóides. Entre os fatores investigados, a relação Carbono/Nitrogênio contribui com um efeito significativo sobre a biomassa, teor de lipídios e produção de carotenóides. Nesse estudo, a produção de lipídios e carotenóides foram melhoradas em um biorreator agitado com pH controlado em 6,0 e taxa de aeração de 2vvm. Em fermentação, a maior produção de lipídios foi de 6,05g/L com um teor lipídico celular de 60,7% e produção de carotenóides de 135,25mg/L.

Andersen et al. (2003) verificaram que *R. mucilaginosa* produz o ácido rhodotorulico, quando cultivada em condições limitadas de ferro. A levedura foi cultivada em biorreatores com restrição de ferro e fonte de carbono. A sacarose foi a melhor fonte de carbono para a produção do ácido rhodotorulico [$287 \pm 11 \mu\text{mol}$ (g biomassa)] e a produção poderia ser aumentada, completando o meio com os precursores acetato [$460 \pm 13 \mu\text{mol}$ (g biomassa)], ornitina [$376 \pm 6 \mu\text{mol}$ (g de biomassa)], ou ambos [$539 \pm 15 \mu\text{mol}$ (g de biomassa)]. O ácido rhodotorulico foi produzido de modo dependente num pH ótimo de 6,5.

Maldonade et al., (2007) selecionaram e caracterizaram leveduras produtoras de carotenóides na região de Campinas, Brasil. Obtidas em diversos substratos, foram identificadas quatro linhagens como *R. mucilaginosa* e uma *R. graminis*. Neste trabalho, β -caroteno predominou em *R. graminis*, enquanto toruleno foi o principal carotenóide em *R. mucilaginosa*. Os carotenóides extraídos foram identificados através de análise por HPLC.

Lim et al. (2002) estudaram a separação de astaxantina produzida por *Phaffia rhodozyma* por extração com dióxido de carbono supercrítico. Efeitos da pressão de extração, temperatura, taxa de fluxo de CO₂ e o uso de álcool etílico na eficiência de extração foram determinados. O rendimento mais elevado de astaxantina e carotenóides com quantidades iguais de CO₂ (50g) foi de 84 e 90%, respectivamente, em 40°C e 500bar. Os resultados indicam a importância do processo alternativo para extração com solventes orgânicos.

Tinoi et al. (2005) otimizaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* utilizando farinha de resíduos de feijão mungo hidrolisada como substrato e extrato de batata-doce como fonte de carbono. Os estudos foram utilizados seis parâmetros experimentais: concentração de farinha de resíduos de feijão mungo, concentração de extrato de batata doce, pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo. Sob condições otimizadas do peso seco da célula foi de 10,35 $\pm$ 0,13g/L e total de carotenóides foi 3,48 $\pm$ 0,02mg/L usando 23,63g/L de H₂SO₄-hidrolizada farinha de resíduos de feijão *mung*, 51,76g/L de extrato batata doce, pH 5,91, 30,3°C, velocidade de agitação de 258 rpm e tempo de incubação de 94.78h. Os resultados demonstraram eficácia do uso de produto agro-industrial amplamente disponíveis como substrato e a eficiência do método de otimização simples sequencial a obtenção de rendimentos elevados.

3.4. CAROTENÓIDES

A denominação carotenoide teve origem em 1831 por Wackenroder que reconheceu a cenoura, *Daucus carota*, como a primeira fonte de caroteno, então devido ao seu nome científico tem sido aceito como designação (Goodwin, 1952). Estes são um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais, devido à ampla distribuição, diversidade estrutural e funcional. Possuem importância biológica devido as suas propriedades fotoquímicas, bioquímicas e antioxidantes. São responsáveis pelas cores

laranja, amarela, vermelha de frutas, hortaliças, flores, algas, bactérias, fungos, tecidos verdes de plantas e animais (Ribeiro e Seravalli, 2004; Botella-Pavía e Rodrigues-Concepción, 2006; Maldonade et al., 2007).

Os carotenóides fazem parte de um grupo amplo de moléculas que podem ser encontrados em diferentes formas de vida e com diversas funções, que vão desde o seu papel original evolutivo como a fotossíntese, como pigmentos antioxidantes até precursores da vitamina A (Frengova; Beshkova, 2009). São micronutrientes bastante difundidos na natureza, que apresentam poder antioxidante contra muitas doenças. A abundância de carotenóides na natureza é, provavelmente, devido à sua via biossintética, que tem sido demonstrada principalmente em vegetais superiores, algas microscópicas e em alguns gêneros de bactérias e fungos (Kaiser et al., 2007).

Estruturalmente, os pigmentos carotenóides são caracterizados por uma cadeia alifática, constituída por um sistema de duplas ligações conjugadas com grupamentos metila. São compostos químicos da classe dos hidrocarbonetos; e de seus derivados oxigenados. Estes dois grupos principais podem ser estruturalmente subdivididos em sete grupos: hidrocarbonetos; álcoois; cetonas; epóxidos; éteres; ácidos e ésteres (Villela, 1976; Goodwin, 1965).

A variação de cor dos carotenóides ocorre devido a pequenas modificações da cadeia principal. A estrutura básica reflete no modo de biossíntese e consiste de oito unidades isoprenóides unidas, conferindo-lhes alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (Davies, 1976; Villela, 1976). As propriedades de absorção da luz dos carotenóides derivam do constituído grupo cromóforo, a cadeia poliênica. Nesse contexto, um cromóforo de sete ou mais duplas ligações conjugadas confere a capacidade de absorver a luz na região visível, atribuindo-lhes colorações do amarelo ao vermelho (Britton et al., 1995). A cadeia poliênica também confere à molécula alta susceptibilidade à degradação oxidativa e à isomerização geométrica causada pela luz, calor ou ácidos (Davies, 1976; Britton et al., 1995).

De acordo com estudos realizados, cerca de 800 carotenóides foram isolados e mais de 600 tiveram as estruturas elucidadas, sendo esses, derivados do mesmo esqueleto isoprenóide C_{40} , este esqueleto básico pode ser modificado por diferentes rotas, tais como hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, substituição, eliminação, adição e rearranjo (Villela et al., 1966; ; Rodriguez-Amaya, 1993b; Ribeiro e Seravalli, 2004).

Diversas aplicações específicas competem aos carotenóides, como corantes, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos e outros fins biotecnológicos. Dentre os carotenóides, o β -caroteno é o mais conhecido e de possível ação protetora contra o câncer, geralmente atribuída ao seu caráter antioxidante em reduzir danos celulares ou teciduais, mas efeitos na regulação de genes também podem estar envolvidos (Choudhari et al., 2008; Bhosale; Bernstein, 2004). Este contém dois anéis β -ionona, sendo o único capaz de formar duas moléculas de vitamina A (Três et al., 2007). Outro carotenoide amplamente distribuído é a astaxantina, principal pigmento encontrado em crustáceos e saimonídeos e em vários pássaros incluindo certos flamingos e íbis, algas verdes, como *Neochloris wimmeri* e *Chlamydomonas nivalis*, bactérias incluindo *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* sp, bem como a levedura *Phaffia rhodozyma* e outros fungos do gênero *Peniophora* (Johnson; An, 1991; Vazquez et al. 1997; Bonfim, 1999; Akiba et al. 2000; 2001).

Astaxantina apresenta forte ação sob os radicais livres, proteção contra peroxidação dos lipídios e danos da oxidação do colesterol LDL, membranas celulares, células e tecidos. Além disso, tem como funções biológicas, proteção contra oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados essenciais, aos efeitos da luz UV e aumento da resposta imunológica (Zhong-Ce et al. 2006; Zheng et al. 2006).

Dentre os lipídios produzidos por leveduras, um destaque é o ácido oléico, tanto na produção como na utilização. O ácido oléico é um ácido graxo o qual participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese de hormônios. Apresenta cadeia longa com 18 carbonos na sua estrutura, e é considerado um ácido graxo insaturado (Silva; Gioielli 2006).

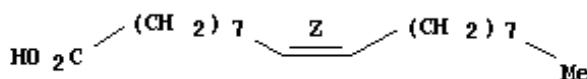
3.5 ÁCIDO OLÉICO

O Ácido Oléico ou Ácido (9Z)-9-octadecenóico (IUPAC) é um ácido carboxílico com fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_2$ (Figura 1) de cadeia longa, insaturado, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, é um ácido graxo da família ômega. Participa da construção da membrana celular, síntese de hormônios, é bastante utilizado como emoliente em cosméticos, apresenta um efeito benéfico na redução da oxidação do colesterol LDL (De Angelis, 2001). Por não se tratar de um ácido graxo essencial o ácido oléico pode ser sintetizado “de novo” pelo organismo. A sua ingestão

é elevada em diversas populações sendo o segundo ácido graxo mais consumido no mundo (Us Department Of Agriculture, 2008).

Os lipídios podem ser sintetizados por diversos microrganismos, entre eles estão os fungos filamentosos, leveduras e algas (Silva e Gioielli 2006; Lima et al. 2001). As espécies de *Rhodotorula* acumulam cerca de 60% do peso seco em lipídios, sendo considerada uma SCO – *single cell oil* por apresentar mais de 20% do seu peso seco composto por lipídios (Dai et al. 2007). Toda a composição lipídica depende de variáveis do cultivo, como composição do meio, tempo de incubação, aeração e iluminação (Easterling et al. 2009). O ácido oléico é um dos ácidos graxos encontrado na fração éster da astaxantina, a presença desses ésteres sugere uma predominância de formas esterificadas. Contudo a avaliação desses ésteres não é uma evidência que a produção de astaxantina é realizada pelo microrganismo (Yuan e Chen 1999; Stewart et al. 2008).

Figura 1: Fórmula estrutural do ácido oléico - $C_{18}H_{34}O_2$



Fonte: Anvisa

Bhuiyan et al. (2014) analisaram perfis de ácidos graxos de *Rhodotorula mucilaginosa* e outras leveduras isoladas da Antártida e não-Antártida. As leveduras foram cultivadas em meios de cultura YEP complementado com 0,3% sulfato de amônio e 0,3% de potássio ortofosfato di-hidrogenado sob agitação de 150rpm em 5°C e 15°C para as da Antártida e 15°C e 25°C para as não-Antártida. A extração foi feita com os solventes clorofórmio e metanol. Foi feita análise por CG-MS onde foi constatado que *R. mucilaginosa* isolada da Antártida produziu 44% e 45% de ácido oléico no cultivo de 5°C e 15°C, respectivamente. Já o isolado não-Antártida de *R. mucilaginosa* a 25°C produziu 77% de ácido oléico, e 72% quando cultivada a 15°C, nesse ultimo cultivo havendo pouca mudança.

Yen e Chang 2014, estudaram a produção de lipídios totais por *R. glutinis* a partir do cultivo em matéria-prima de baixo custo como a palha de arroz hidrolisada como fonte de carbono em biorreator *airlift*, onde alcançou o maior crescimento de massa celular em comparação com o tanque de agitação. O teor de lípidos foi de 34,3 ±0,6% foi obtido em um lote de transporte aéreo com 60g de açúcares/L a uma taxa de

aeração de 2 vvm. Obtiveram nos resultados uma alta concentração de ácido oléico e ácido linoléico, sendo estes os ácidos graxos predominantes.

Singh et al. (2013) estudaram e caracterizaram dez cepas de leveduras isoladas de núcleos de gelo do Ártico. Dentre elas estava *R. mucilaginosa* e foi observada uma concentração de ácidos gordos insaturados a partir do crescimento em diferentes temperaturas (1, 4, 15 e 20°C). Foi observada uma produção de 74.44%, 89.38%, 70.88% e 69,90% respectivamente. Também foi analisada a porcentagem de ácido oléico deste isolado a partir do crescimento nas diferentes temperaturas, onde este *R. mucilaginosa* apresentou 16.5%, 19.5%, 33.8% e 32.8% de ácido oléico respectivamente. Dessa forma, concluem que a diminuição da temperatura aumenta a concentração de ácidos gordos insaturados totais. E que estes ácidos graxos, eventualmente, ajudam as cepas a sobreviver no frio glacial.

Cardoso et al. (2004) avaliaram a influencia da administração tópica de ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) e não-essencial (ácido oléico) na cicatrização de feridas cutânea em ratos, afirmaram através de uma análise macroscópica que o menor tempo de cicatrização foi no grupo tratado com ácido oléico, em seguida de ácido linoléico. Até os dias atuais, na prática, se faz uso de óleo de girassol no tratamento de feridas, porém se faz necessário aguardar por novas evidências em seres humanos.

O ácido oléico pode ser utilizado com diversas finalidades na saúde, apresenta propriedades benéficas, como a diminuição da oxidação de colesterol LDL. Atua como prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes (Giugliano; Esposito 2008). A principal fonte de ácido oléico é a alimentação, podendo estar presente em óleos vegetais, sementes e frutos. Há uma controversa a respeito do efeito na função imune, alguns estudos relatam ausência de atividade imunomoduladora (Yaqoob et al.1998), outro estudo já relatou uma resposta supressora do ácido oléico (Cunha, 2001). A presença do ácido oléico está relacionada com o aumento da produção e a indução de algumas substâncias semelhantes a hormônios, como a prostaglandina, aumentando a permeabilidade vascular no processo inflamatório (Jones 2002).

Dessa forma, devido a sua utilização em processos biotecnológicos e também na saúde, o ácido oléico merece destaque na sua produção e nos estudos relacionados ao seu mecanismo de ação.

3.6 O GÊNERO *Candida* E CANDIDÍASE

O gênero *Candida* apresenta aproximadamente 200 espécies de leveduras na sua forma assexuada, comumente se reproduzindo por brotamento. Contudo, algumas dessas espécies podem apresentar sua forma teleomórfica. Algumas espécies de *Candida* chegam a apresentar um estágio micelial com produção de micélio verdadeiro e/ou pseudomicélio, sendo esta característica importante na patogenicidade do fungo. As espécies de *Candida* foram classificadas como uma levedura gram positiva, dimórfica, sapróbio e de virulência limitada (Sobel et al, 1998; Spinillo et al, 1992). Em determinadas condições fisiológicas algumas espécies, como *C. albicans*, por exemplo, chegam a produzir clamidosporos, os quais são estruturas de resistência (Pappas, 2006; Lacaz et al., 2002; Murray et al., 2000; Levinson; Jawetz, 1998).

As espécies de *Candida* podem ser encontradas em diversos substratos orgânicos, geralmente estão presentes em saprobiose, fazendo parte da microbiota humana. As espécies de *Candida* vêm sendo utilizadas em diversos segmentos, a exemplo da *C. lipolytica* nos processos industriais. Já outras espécies, cerca de 10%, causam infecções/doenças em humanos, a exemplo de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* entre outras (Brasil, 2010; Pappas, 2006; Sidrim; Rocha, 2004; Levinson; Jawetz, 1998).

Historicamente, *C. albicans* é a espécie mais frequente como agente etiológico, é uma levedura caracterizada, pela natureza, dimórfica, assim apresenta hifa, pseudo-hifa ou pseudomicélio. Essa mudança de fase na morfologia, o qual ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é uma característica significativa com implicações na patogênese e no diagnóstico das infecções causadas por essa levedura. Em condições *in vitro*, pode ser obtida a partir de seu crescimento em meios de cultura sólido ou líquido e a obtenção na forma micelial ou pseudomicélio, bem como clamidósporo são influenciadas por vários fatores ambientais, tais como, condições de crescimento e alterações na composição de meios (Pappas, 2006; Lacaz et al., 2002).

Em 1839, Langenbeck observou pela primeira vez a mais descrita e estudada levedura patogênica a espécie humana, atualmente conhecida por *C. albicans*. Esta espécie foi detectada em pacientes com aftas bucais, apesar de não ter sido considerado o agente etiológico da doença. Em seguida, em 1842, David Gruby estabeleceu a candidíase oral e classificou esse mesmo microrganismo no gênero *Sporotrichum*. Posteriormente, em 1846, Berg iniciou um estudo detalhado da levedura, afirmando sua

relação com a lesão. Em 1853, Charles Robin denominou de *Oidium albicans*, porém em 1890 ele foi renomeado por Zopf como *Monilia albicans*. E finalmente, em 1923, Berkhout incluiu no gênero *Candida* e denominou a espécie como *Candida albicans* (Sidrim e Rocha, 2004).

Desde então, o termo candidíase é utilizado genericamente para determinar as infecções fúngicas ocasionadas por espécies de *Candida*. Este gênero de leveduras faz parte da microbiota normal do ser humano, sendo encontrado comumente na pele, trato gastrointestinal, mucosa oral e particularmente na mucosa vagina das mulheres. Entretanto, alguns fatores podem predispor as leveduras do gênero *Candida* de sapróbias se tornarem patógenas, causando então variados quadros de candidíase que ao ocorrer na genitália feminina indica vulvovaginite (Pfaller e Diekema, 2007; Prado et al., 2009).

No geral, as infecções por *Candida* são de origem endógena, sendo decorrentes da proliferação ou da mudança do sítio corpóreo da levedura induzidos por algum fator predisponente. Contudo, há a possibilidade de infecções exógenas a exemplo da veiculação através das mãos, aparelhos de ventilação, sondas e cateteres no ambiente hospitalar (Perlroth et al., 2007).

3.7 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio de candidíase vaginal em sua vida. As infecções por cepas de *Candida* não *albicans* têm aumentado nos últimos anos. Clinicamente, essas infecções, não são diferenciadas, pois causam os mesmos sintomas (Sobel, 2007).

O corrimento vaginal é um dos inúmeros motivos pelo qual as mulheres buscam atendimento médico. Sendo as vulvovaginites o principal diagnóstico, constituindo um dos problemas ginecológicos mais comuns (Pedroso, 2009). A *Candida*, presente naturalmente na mucosa, diante de alguns fatores importantes como gravidez, antibioticoterapia, tratamento hormonal dentre outros, desencadeia alterações locais caracterizando assim uma vaginite. Esta condição clínica pode vir associada, ou não, a corrimento e processos inflamatórios secundários do trato urinário (Sidrim; Rocha, 2004; Tozzo e Grazziotin, 2012).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda causa entre as vulvovaginites, podendo ser ainda mais frequente durante a gravidez (Bombardelli et al., 2007; Sobel,

2010; Konaté et al., 2013). Estima-se que cerca 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio, sendo 5% de caráter recorrente (CVVR), ou seja, apresenta três ou mais episódios no período de um ano (Sheary et al., 2005; Konaté et al., 2013).

A microbiota normal da vagina é rica em bactérias produtoras de peróxido, os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, cuja produção e secreção são estimuladas pelo hormônio feminino, estrogênio. Esse mecanismo desenvolve um ambiente vaginal ácido, com pH em torno de 4,5, favorecendo a colonização de *Candida* e dificultando a proliferação da maioria dos patógenos (Val; Almeida-Filho, 2001; Daniel & Robinson, 2005). A CVV pode ser causada por diversas espécies de *Candida*, em destaque *C. albicans*, a qual é responsável por 85 a 90% dos casos, seguida pelas espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilopsis*. Ademais, o mecanismo de transformação da colonização em infecção é multifatorial (Feuerschuette et al., 2010).

Os fatores que contribuem para a defesa vaginal natural vão desde o equilíbrio microbiológico da microbiota presente na vagina até a presença das imunoglobulinas da classe IgA e IgG, dos polimorfonucleares e monócitos (Giraldo et al., 2006). Entretanto, existem situações que predispõem ao aparecimento da candidíase, entre esses fatores a gravidez ainda é apontado como a mais frequente (Almeida Filho et al., 1995; Nardin et al., 2000; Mardh et al., 2002; Llovera Suarez, 2004; Xu; Sobel, 2004).

Os usos de anticoncepcionais orais com altas doses de estrogênio e o *diabetes mellitus*, propiciam o aumento na concentração de glicogênio vaginal e consequentemente uma maior proliferação fúngica. Somado a isso, o uso de dispositivos intra-uterinos, obesidade, antibioticoterapia, corticoterapia e drogas imunossupressoras, aumentam o risco de infecção causada por *Candida* (Fernande; Machado, 1996; Nardin et al., 2000; Garcia & Svidzinski, 2002; Daniel & Robinson, 2005; Konaté et al., 2013).

Em função da baixa dosagem de estradiol, o uso de anticoncepcionais e/ou a reposição hormonal vem sendo discutido. Os anticoncepcionais foram descritos como importantes fatores de risco para candidíase, entretanto, com os estudos, sua relevância é discutível, havendo controversas na literatura, devido à administração desses medicamentos em pequenas doses. Dessa forma, haverá uma menor interferência, deixando as mulheres menos vulneráveis (Bauters et al., 2002; Grigoriou et al., 2006; Holanda et al., 2007; Konaté et al., 2013).

Konaté et al (2013) realizaram um estudo a fim de obter dados referentes a CVV ocorridas em 400 mulheres com suspeitas clínicas de vulvovaginites, oriundas do estado de Abijan, Cote d' Ivoire. Destas, 172 (42%) apresentaram diagnóstico conclusivo para CVV. Sendo *C. albicans* (82,5%), seguido de *C. glabrata* (10,5%) as espécies mais frequentes.

No Brasil, Ferrazza et al (2005) estudaram mulheres imunocompetentes de dois estados da região sul, Santa Catarina e Paraná, onde constataram que *C. albicans* foi a espécie prevalente com 77,4% e 50,0% respectivamente.

Estudo realizado na Índia objetivou determinar a frequência de espécies de *Candida* em mulheres de diferentes faixas etárias. Foram coletadas amostras de secreção vaginal de 1.050 mulheres com sintomas de vulvovaginites. Onde 215 (20,47%) foram positivas para espécies de *Candida*. *Candida albicans* foi responsável por 46,9% dos casos, seguido de *C. glabrata* (36,7%), *Candida parapsilosis* (10,2%), *C. tropicalis* (2,8%), *C. krusei* (1,4%), e *C. kiefneri* (1,9%). Os sinais e sintomas mais comuns entre as 215 mulheres com culturas positivas foram prurido com ou sem secreção vaginal e eritema vaginal (Ahmad e Khan 2009).

Rad et al 2011, estudaram as espécies de *Candida* associadas à candidíase vulvovaginal em uma amostra da população iraniana. Foram coletadas amostras de secreção vaginal de 200 pacientes com quadro clínico sugestivo da candidíase vulvovaginal. Um total de 191 isolados foram obtidos a partir de 175 amostras vaginais. Foi atribuído *C. albicans* como responsável por 67% dos casos, ocorrendo infecções simples e mistas. As outras espécies identificadas foram *C. glabrata* (18,3%), *C. tropicalis* (6,8%), *C. krusei* (5,8%), *C. parapsilosis* (1,6%) e *C. guilliermondii* (0,5%). Nesse estudo foram vista infecções mistas em 10,3% dos pacientes e a combinação mais comum foi *C. albicans* associada a *C. glabrata*.

Sharma et al., (2013) pesquisando a frequência de CVV em um hospital terciário de Nova Deli, Índia, isolaram *C. nivariensis* como agente etiológico. Foram identificados 100 isolados de *C. glabrata* a partir da secreção vaginal de pacientes com CVV, tendo a identificação do agente realizada por métodos fenotípicos. Desses, quatro foram identificadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) como *C. nivariensis* e confirmadas por sequenciamento. Quanto a susceptibilidade antifúngica, um isolado de *C. nivariensis* apresentou CIM de 16µg/mL frente à fluconazol, os demais isolados foram susceptíveis ao voriconazol, itraconazol, posaconazol,

isavuconazole, anfotericina B, e equinocandinas. Fenotipicamente *C. nivariensis* é uma espécie semelhante a *C. glabrata*, sendo necessária a identificação por métodos moleculares.

Li et al. (2014), na China, isolaram *C. nivariensis* e *C. bracarensis* a partir de pacientes com CVV. Essas espécies foram encontradas entre os isolados de *C. glabrata*, os quais foram identificados por meio do sistema API 20 C AUX para *Candida*. A identificação desses isolados foi confirmada, através da detecção da região ITS1 do RNA ribossomal. Foram 301 isolados identificados como *C. glabrata*, 293 (97,34%) foram confirmados como *C. glabrata*, sete isolados foram identificados como *C. nivariensis* (2,33%) e um isolado foi identificado como *C. bracarensis* (0,33%). Os isolados de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* foram confirmados por sequenciamento. Nesse estudo, todos os isolados *C. nivariensis* foram sensíveis à nistatina e sensível dose-dependente ao fluconazol, itraconazol, miconazol, e clotrimazol. O isolado de *C. bracarensis* foi sensível a nistatina e os azólicos testados.

Shan et al. (2014) na China, conseguiu autenticar *C. africana* a partir de isolados de pacientes com CVV. Os isolados foram inicialmente identificados como *C. albicans* por meio do uso do sistema API de *Candida*. De isolados vaginais identificados anteriormente como *C. albicans*, 1014 foram retrospectivamente reexaminados. E através da detecção do gene HWP1, constatado que 15 destes isolados eram *C. africana*, os quais foram susceptíveis a nistatina, fluconazol, itraconazol, miconazol e clotrimazol.

Gamarra et al. (2014) estudaram 121 leveduras isoladas de 118 pacientes com candidíase vulvovaginal. As espécies isoladas foram *C. albicans* (85,2%), seguido por *C. glabrata* (5%), *Saccharomyces cerevisiae* (3,3%), e *C. dubliniensis* (2,5%). Testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados, sendo observados para fluconazol e itraconazol uma susceptibilidade reduzida nas cepas de *C. albicans*. Todos os isolados de *C. glabrata* apresentaram baixas CIMs ao fluconazol. O clotrimazol apresentou excelente atividade contra todos. Todas as cepas foram sensíveis a nistatina.

Zhu et al. (2014) estudaram as características clínicas e suscetibilidades *in vitro* de *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* isolados de pacientes com CVV. Analisaram 63 amostras de *C. parapsilosis* obtidas de CVV. Seguidas de análises moleculares, os isolados foram caracterizados como *C. parapsilosis* stricto sensu (77,8%), *C. orthopsilosis* (7,9%) e *C. metapsilosis* (14,3%). Os sinais e sintomas da CVV causadas por lato sensu *C. parapsilosis*, incluindo prurido e eritema, eram mais

leves do que as causadas por *C. albicans*. Nenhum dos isolados de *C. parapsilosis* lato sensu foram resistentes ao fluconazol, miconazol e itraconazol. Tanto *C. parapsilosis* lato sensu e *C. albicans* foram sensíveis à nistatina. Concluíram que *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. orthopsilosis* estão intimamente relacionados e as espécies de *C. metapsilosis* estavam presentes em associação nas amostras de pacientes com CVV. Os sintomas e sinais de CVV causadas por *C. parapsilosis* são mais leves do que as causadas por *C. albicans*. A susceptibilidade antifúngica e eficácia terapêutica em pacientes colonizados por *C. parapsilosis* lato sensu foram semelhantes às observadas em pacientes colonizados por *C. albicans*.

De Cremer et al. (2014) estudaram 1600 compostos em combinação com uma concentração sub-inibitória de miconazol. A sinergia entre os potenciadores e miconazol melhor identificados foi caracterizada. Entre os que apresentaram ação sinérgica associada ao miconazol estão o hexaclorofeno, pamoato pyrvinium e artesunato. Esses agiram sinergicamente em biofilmes formados por *C. albicans*. Foi constatado que não há nenhum efeito sinérgico entre artesunato e fluconazol, caspofungina ou anfotericina B. Sendo assim, os dados revelaram um aumento da atividade antibiofilme de miconazol por artesunato, apontando para o potencial na terapia de combinação entre miconazol e artesunato para tratamento de infecções relacionadas com formação de biofilme por *C. albicans*.

Paiva et al. (2012) realizaram uma avaliação *in vitro* da formação de biofilme por diferentes espécies de *Candida* isoladas de CVV, onde todas as leveduras demonstraram a capacidade de produzir biofilme em até 48h após a conclusão do ensaio. Mesmo sendo apenas um isolado a partir de cada espécie de *Candida*, os resultados apresentaram uma alta formação de biofilme. Esses resultados contribuíram com a teoria de que o potencial de virulência é multifatorial podendo estar envolvidos na fisiopatogenia da CVV.

Kovachev et al. (2014) realizaram um estudo com intuito de determinar a eficácia clínica da terapêutica para o tratamento da infecção vaginal por *C. albicans*. Testaram azólicos isolados e em combinação com probiótico local. Foram estudadas 436 mulheres com candidíase vaginal onde foram submetidas a tratamento com fluconazol e fenticonazol vaginal, no mesmo dia; no entanto, aplicações de um probiótico vaginal contendo *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* também foram administradas

começando no quinto dia após tratamento “azol”. Concluíram que a aplicação combinadas local de probióticos após a administração de azóis para o tratamento de infecções vaginais por *C. albicans* aumentam a eficácia da terapêutica em mais de 90% e podendo prevenir recaídas.

Ogouyèmi-Hountoa et al. (2014) estudaram 131 mulheres com sinais clínicos de CVV num período de quatro meses no Benim, África. Observaram que os principais sintomas foram corrimento vaginal (74,8%), seguido por prurido vulvar (51,9%) e dispareunia (36,6%). Obtiveram 51 (38,9%) casos positivos com isolamento em meio de cultura. Isolou-se *Candida albicans* em 96,1% dos casos, seguido de *C. glabrata* em 3,9%. Os fatores de risco envolvidos foram: gravidez, antibioticoterapia, uso de vestimentas inadequadas como roupas íntimas sintéticas e calças apertadas. Além de *Candida*, *Gardnerella vaginalis* foi encontrada em 36,6% das amostras com uma associação com *C. albicans* em 28,2% dos casos.

Choukri et al. (2014) tiveram como objetivo determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica *in vitro* de um grande número de isolados clínicos de *Candida* spp.. Caracterizaram 200 isolados, sendo 113 *C. albicans*, 54 *C. glabrata*, 11 *C. krusei*, 11 *C. tropicalis* e 11 *C. parapsilosis*. Os “azóis” (clotrimazol, miconazol e econazol) determinaram CIM de 0,06mg/L para *Candida albicans*, já a nistatina exibiu uma CIM de 4mg/L. Para as espécies não-albicans, as concentrações inibitórias mínimas variaram de 0,5 a 8mg/L, de 1 a 4mg/L e 0,12 a 4 mg/L, para o econazol, miconazol, clotrimazol, respectivamente. Nistatina manteve a CIM de 4mg/L para todas as espécies não- albicans testadas. Esses dados confirmam a susceptibilidade de *C. albicans* para os antifúngicos tópicos mais utilizados, apoiando a utilização de terapêuticas alternativas, tais como nistatina, para o tratamento de candidíase vaginal causada por espécies de não-albicans.

Liu et al. (2014), num período de 2003 a 2012, na China, estudaram isolados de *Candida* a partir de pacientes com CVV afim de determinar a susceptibilidade antifúngica das espécies. Obtiveram 3181 isolados de leveduras obtidas a partir de 3141 pacientes com CVV. Duas espécies de *Candida* foram isolados a partir de cada um dos 40 pacientes (1,3%, 40/3141). *C. albicans* foi a espécie de *Candida* predominante (2705 cepas, 85%) em CVV, seguido por *C. glabrata* (337 cepas, 10,6%), *C. parapsilosis* (49 cepas, 1,5%), *C. tropicalis* (31 cepas, 1%), *Saccharomyces cerevisiae* (23 cepas, 0,7%), *C. krusei* (15 cepas, 0,5%), *C. famata* (11 cepas, 0,4%), *Rhodotorula* sp. (6 cepas,

0,2%), e *C. lusitaniae* (2 cepas, 0,1%). Foi realizado a susceptibilidade antifúngica em 1942 isolados de pacientes com CVV. Todos os isolados de *C. albicans* obtidos foram sensíveis à nistatina. A taxa de *C. albicans* resistente ao fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol foi de 1,1% (18/1612), 2,2% (36/1612), 4,2% (68/1612), e 0,9% (14/1612). A taxa de resistência não-albicans para fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol e foi de 11,8% (39/329), 2,5% (8/329), 1,8% (6/329), e 4,3% (14/329). Com esse estudo concluíram que há predominância de *C. albicans* em isolamentos desse substrato e a pouca resistência aos antifúngicos padrão.

Lattif (2011) estudou a tipagem molecular de espécies de *Candida*, isoladas de mulheres diabéticas com CVV na Índia, junto à susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol. Identificaram 57 espécies de *Candida*, sendo elas *C. albicans* e *C. glabrata*. A genotipagem mostrou que todos os isolados de *C. albicans* foram geneticamente heterogêneos, porém geneticamente relacionados. Já a análise do padrão de bandas de DNA obtidos após a PCR das cepas de *C. glabrata* mostrou que se assemelhavam ao genótipo "A". Nos testes de suscetibilidade dos isolados mostrou que mais de 93% dos isolados de *Candida* foram susceptíveis ao fluconazol, com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 0,5µg/mL a 8µg/mL.

Carrara et al. (2009) realizaram um estudo do efeito do diabetes experimental sobre o desenvolvimento e manutenção da candidíase vulvovaginal em ratas. Visaram verificar sua influência sobre a CVV. Os resultados apontaram diferentes glicemias entre os grupos controle e experimentais. E concluíram que *Diabetes mellitus* favorece à colonização vaginal e infecção por *C. albicans*.

Zhang et al., (2014) com intuito de novas perspectivas para o tratamento, estudaram mulheres com e sem HIV e investigaram a susceptibilidade de *Candida* spp. ao fluconazol. Nesse estudo havia 59 mulheres com HIV e 24 mulheres sem HIV. Foram recuperadas 280 cepas de *Candida* a partir de esfregaços orais e vaginais de mulheres com e sem infecção pelo HIV. Houve colonização por *C. albicans* e espécies não-albicans nos dois locais. Nos testes de susceptibilidade, isolados de *Candida glabrata* foram caracterizadas como dose dependente e outros resistentes ao fluconazol.

Cerca de 5% das mulheres apresentam quadro de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR). Rosentul et al (2014), apresentaram um estudo com 119 pacientes com CVVR, onde demonstraram a associação de susceptibilidade a CVVR com variação genética em TLR2, que pode melhorar significativamente, modulando os

mecanismos de defesa do hospedeiro contra *Candida*. Contudo estudos adicionais são necessários para avaliar o papel da variação genética.

Usluogullari et al. (2014) na Turquia, realizaram o primeiro estudo com intuito de investigar a correlação do polimorfismo do gene humano Dectina-1 Y238X com a patogênese de CVVR. O resultado deste estudo sugeriu que não existe uma correlação entre este polimorfismo e CVVR.

3.8 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM MODELO EXPERIMENTAL

Os modelos experimentais são realizados com culturas de *C. albicans* inoculadas em animais imunossuprimidos, simulando os mais comumente fatores predisponentes a candidíases vulvovaginal ou para verificar o efeito de drogas antifúngicas (Black et al. 1998; Martines et al. 2001; Zhao et al. 2002).

Segal e Josef-Lev (1995) estudaram a indução e prevenções de candidíase vaginal em ratas que foram induzidas a diabetes por injeção intraperitoneal com 160mg/Kg de estreptozotocina (SZ), a qual induziu diabetes estáveis e não letal detectada entre 2–7 dias pós-injeção de SZ. Ratas diabéticas e controle não-diabéticas foram inoculados intravaginalmente com 10^7 e 10^{10} células da suspensão de *C. albicans*. A infecção foi avaliada pelo número de ratas infectadas após 3 dias da inoculação e a taxa de infecção durante 35 dias seguidos. Todas as concentrações de *C. albicans* investigadas induziram a infecção vaginal em ratas diabéticas, enquanto nos controle não-diabética apenas 40% das ratas inoculadas com dose mais baixa (10^7 UFC) desenvolveram a infecção. Candidíase vaginal foi 10 vezes mais severa com período de infecção prolongado em ratas diabéticas em relação ao controle não-diabéticas.

Amostras de *C. albicans* foram comparadas com relação à habilidade de causar infecção vaginal em modelo experimental com ratas, bem como os potenciais vaginopáticos dos isolados correlacionados com a expressão de dois genes de proteinases aspartil (SAP1 e SAP2) e a aderência *in vivo* ao epitélio vaginal. A reação *Dot blot* e análise *Northen blot* com extração de RNA do fluido vaginal de ratas infectadas com amostras altamente vaginopáticas H12 e 10261 demonstraram a expressão de ambos SAP1 e SAP2 durante a primeira semana de infecção. Contrariamente, nenhum gene foi expresso durante a infecção por uma amostra não-vaginopática. A amostra moderadamente vaginopática também expressou ambos os genes, mas o nível de SAP1 no RNAm aparentemente diminuiu em relação a SAP2.

Nenhum gene foi expresso até mesmo por uma amostra altamente vaginopática, após a primeira semana de infecção, concomitante com o decréscimo no número de organismos na vagina. A análise da aderência *in vivo* mostrou que amostras não-vaginopática aderiram às células do epitélio vaginal menos rapidamente do que amostras altamente e moderadamente vaginopática. Desta forma adicional à inabilidade para expressar SAP1 e SAP2 *in vivo*, amostras não-vaginopática não colonizam as células hospedeiras na mesma extensão como as outras amostras testadas. Logo, os resultados demonstram que expressão *in vivo* de dois genes de proteinase aspartil durante candidíase vaginal sugere associação com o estabelecimento de infecção vaginal (De-Bernardis et al. 1995).

Stringaro et al. (1997) observaram a detecção e localização ultraestrutural de SAP⁺ em *C. albicans* em modelo experimental com ratas infectadas vaginalmente. Duas amostras de SAP⁺ e um SAP⁻ de amostra de fungo, que desenvolveram experimentalmente alto e baixo potencial vaginopático, respectivamente. Ambas as amostras SAP⁺ consistentemente produziram nível de SAP na vagina de rata, enquanto a outra amostra SAP⁻ não produziu nenhuma medida de SAP. A microscopia eletrônica de secção finas de esfregaço vaginal fixado quimicamente, mostrou evidência clara de hifa nas amostras proteolíticas de *C. albicans* as quais invadem camadas superiores do epitélio queratinizado da vagina. A célula fúngica exibiu uma camada fibrilar sobre a parede celular marcada na intermistura de fungo e material vaginal, principalmente evidenciada na extremidade da hifa. A técnica immunogold com o uso de apoliclinal especificamente gerou anticorpos monoclonal mostrou que SAP está essencialmente localizada na parede celular de *C. albicans* inicialmente durante a infecção.

A imunidade sistêmica mediada por célula (IMC) é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* na vagina, recentemente em modelo experimental de candidíase vaginal dependente de estrógeno, mostrou que IMC de *Candida*-específica tipo Th1 induzida por imunização com antígeno filtrado de cultura de *Candida*, não tem efeito nos níveis de população de *Candida* na vagina, durante o curso de uma infecção vaginal. O estudo demonstrou que ratas que teve uma segunda inoculação vaginal na presença de IMC de *Candida*-específica tipo Th1, induziu uma prévia infecção vaginal. A resposta de hipersensibilidade tipo tardio, concomitante com o nível significativo menos células de *Candida* na vagina do que em ratas primariamente infectadas. Em adição, ratas infectadas secundariamente, foram

fragmentadas e a penetração superficial dentro do epitélio foi reduzida. Experimentos adicionais mostraram que ratas vaginalmente imunizadas não estão protegidas de candidíase sistêmica ou gastrointestinal, em contraste com ratas com infecção vaginal secundária. Os resultados sugerem que um nível moderado de proteção local contra infecção de *Candida* vaginal pode ser alcançado através de imunização vaginal, o papel protetor de *Candida*-específica periférica tipo Th1 que reativa a mucosa vaginal parece ser limitado (Fidel Júnior et al. 1995).

A imunização é uma proteção significativa contra candidíase vaginal, assim ratas BALB/C foram experimentalmente imunizados por via subcutânea com extrato de *C. albicans*, ao passo que ratas C57BL/6 (B6) não foram previamente imunizados. A proteção a candidíase vaginal foi transferida as ratas BALB/C por uma população de células do baço ou fígado. A remoção de CD3 ou CD4, mas não a célula CD8 antes da transferência, revogou completamente a resistência de candidíase vaginal. As amostras de recombinante inato (RI) das ratas BALB/C também apresentaram imunoproteção, pois os loci presentes nos cromossomos 3, 7, 8 e 18 que são responsáveis pela regulação à proteção vaginal estão presentes nos RI. Estes resultados podem contribuir para a compreensão dos fatores genéticos que controlam a resposta imune às infecções vaginais (Mulero et al. 1998).

Fidel Júnior et al. (1999b) estudaram em modelo experimental o efeito de estrógeno sobre candidíase vaginal e sugere que o local da IMC é mais importante que a IMC sistêmica para proteção contra vaginite. O estudo demonstrou que comparando rata não infectada, pouca ou nenhuma mudança na porcentagem ou tipo de células T vaginal ocorreu durante a infecção primária ou infecção secundária na vagina, onde a proteção parcial foi observada. Os resultados indicam perdas de efeitos demonstrados por IMC sistêmico e sugerem que o local das células T são importantes, e estão funcionando sem apresentarem aumentos de números significativos na mucosa vaginal durante a infecção.

Anticorpo humoral (Ab) e resposta imune celular específica a *Candida* vaginal em ratas pseudoestrus foram investigadas durante três infecções sucessivas por *C. albicans*. Após a primeira infecção protetora, Abs contra antígenos de aspartil proteinase e manana estão presentes no fluído vaginal, e o título claramente aumentado durante as duas subseqüentes infecções curativas. Em todos os animais, aproximadamente 65% e 10% de linfócito vaginal (LV) era CD3 (célula T) e CD3–

CD5⁺ (células B), respectivamente. Dois terços de células T CD3⁺ expressaram alfa/beta e um terço expressou gama/delta. Esta proporção flutuou ligeiramente durante três infecções por *C. albicans*, mas nenhuma diferença significativa entre ratas infectadas e não infectadas foi encontrada. Mais importante foi a variação na proporção entre as células T CD4⁺/CD8⁺, particularmente nas células CD25 que são os receptores alfa da interleucina-2 (De-Bernardis et al. 2000).

Nohmi et al. (1995) examinaram seis hormônios esteróides e verificaram os efeitos sobre o crescimento micelial de *C. albicans*, bem como a atividade inibitória de caseína em um modelo experimental contra o crescimento micelial de *C. albicans* foi examinada *in vitro* usando o método de violeta cristal ou o método de incorporação de glicose. Quatro hormônios esteróides, danazol, estradiol, estriol e testosterona não obtiveram nenhum efeito sobre o crescimento micelial de *C. albicans*, porém progesterona aparentemente converteu a forma de crescimento de *C. albicans* de levedura para hifa. O danazol (10^4 M) suprimiu atividade anti-*Candida* de neutrófilos em ratos não tratados, enquanto que a testosterona, estradiol e estriol não tiveram. A atividade anti-*Candida* de neutrófilos de ratos pré-tratados com estradiol foi claramente suprimida pela progesterona até 10^6 M, a qual corresponde a sua concentração no plasma em mulheres grávidas no terceiro trimestre. A significância fisiológica deste efeito supressivo de progesterona foi discutida em relação à vulnerabilidade de mulheres grávidas a candidíase vaginal.

Fidel Júnior et al. (2000) demonstraram que modelos experimentais dependentes de estrógeno e infecção vaginal por *C. albicans* são amplamente estudados, contudo o papel dos hormônios reprodutivos e/ou seus limites na aquisição de candidíase vaginal contínua pouco esclarecido. Este estudo examinou os efeitos de estrógeno e progesterona sobre vários aspectos em uma infecção experimental juntamente com a resposta imune mediada por célula. Os resultados mostraram, que enquanto a concentração de estrógeno diminui a infecção vaginal induzida por *C. albicans* aumenta a taxa de infecção vaginal em animais inoculados. A infecção experimental não foi observada em ratos tratados com várias concentrações de apenas progesterona. Além disso, progesterona não tem efeito na indução e persistência da infecção na presença de estrógeno. Finalmente, estrógeno foi associado a reduzir habilidades as células do epitélio vaginal para inibir o crescimento de *C. albicans*. Os resultados sugerem que

estrógeno, mas não progesterona, é um fator importante na suscetibilidade para vaginite por *C. albicans*.

De-Bernardis et al. (2002) com o objetivo de verificar a eficácia de imunização, tratou ratas com estrógeno e imunizou por via intravaginal ou intranasal com extrato de manoproteína (MP) ou SAP de *C. albicans*. Ambos os modos de imunização foram igualmente efetivas, induzindo anticorpos vaginais anti-MP e anti-SAP e conferindo um alto grau de proteção contra infecção vaginal pelo fungo. Os dados sugerem que antígenos de fungo podem ser usados para proteger contra vaginite por *Candida*.

Ratas Pseudoestrus tratadas com estrógeno foram inoculadas intravaginalmente com 5×10^4 blastoconídios na fase estacionária de *C. albicans* e lavado de fluído vaginal, e tecidos vaginais foram obtidos no 2º, 4º, 7º, 14º e 21º dias após inoculação. Os resultados mostraram que ratas não tratadas com estrógeno apresentaram alta carga de *Candida* na cultura do lavado do fluído vaginal no segundo dia para o vigésimo primeiro dia após inoculação. Tecido vaginal de ratas inoculadas com *C. albicans* continha uma grande quantidade de hifa na superfície da mucosa, fornecendo meios para estudar a patogênese de infecções de mucosa (Zhao et al. 2002).

Ghelardi et al. (1998) com o objetivo de melhorar significativamente o benefício terapêutico de econazol no tratamento tópico de candidíase vaginal, propor uma nova formulação utilizando o econazol como mucoadesivo em ratos, contudo não se constatou nenhuma diferença na atividade do econazol com o econazol mucoadesivo.

Sorensen et al. (1998) com o objetivo de observar o efeito de Siringomicina E (SR-E) um novo antifúngico produzido pela bactéria *Pseudomonas syringae*, avaliou a eficácia em um modelo experimental de candidíase vaginal. As ratas receberam tratamento intravaginal durante 4 dias com SR-E a 2% em polietilenoglicol (PGE), PGE- 400 ou PGE pomada, ou com clotrimazol a 1% como controle positivo. Culturas fúngicas obtidas da secreção vaginal foram às mesmas anteriormente obtidas ao tratamento com 1º, 5º, 6º e 7º dias. Ambas formulações mostraram uma redução da colonização de levedura na vagina no 5º dia (P. Itoreq 0,06 e P. Itoreq 0,03 para SR-E/PEG-400 e SR-E/PEG-pomada, respectivamente) e SR-E/PEG-Pomada reduziu a colonização no 7º dia (P Itoreq 0,06), quando comparada com controles tratados. No segundo estudo, SR-E foi formulado em três concentrações mais elevadas do SR-E 3%, 6% ou 12% (W/V) e mostrou eficácia de dose dependente. A concentração de 3% não mostrou nenhum efeito, enquanto as doses de 6% e 12% reduziram o número de

leveduras. A dose de 12% mostrou uma redução significativa nos dias 5 (P Itoreq 0,01), 6 (P Itoreq 0,06) e 7 (P Itoreq 0,03), quando comparada com o controle da droga, e no 5º dia foi mais eficaz do que clotrimazol (Itoreq 0,03 de P). Clotrimazol não reduziu significativamente as leveduras na vagina no 6º dia (P Itoreq 0,01) e no 7º dia (P Itoreq 0,01) quando comparado com a droga controle. Nenhuma resposta inflamatória vaginal foi evidenciada pelo exame histológico no animal não infectado e tratado com SR-E e a mesma não foi detectada no plasma, rim ou fígado).

Taylor et al. (2000) compararam a virulência de isolados de *C. albicans* da mucosa em pessoas infectadas por HIV, com e sem infecção refratária a fluconazol, em um modelo experimental de candidíases sistêmica e vaginal. Ratas foram inoculadas por via intravenosa com 2 isolados virulentos com taxa de mortalidade aproximadamente de 70%. Não houve nenhuma diferença *in vitro* nas taxas de crescimento de qualquer isolado, e não se verificou nenhuma associação entre redução de mortalidade e a falha clínica a fluconazol na susceptibilidade antifúngica *in vitro*. Os resultados sugerem que a virulência de *C. albicans* é específica ao tecido e não a um fator no desenvolvimento de infecções refratárias a fluconazol em doenças avançadas por HIV.

Martines et al (2001) sordarinas constituem uma nova classe de agentes antifúngicos com um novo mecanismo de ação envolvendo inibição seletiva da síntese de proteínas fúngicas. A eficácia terapêutica de dois novos azasordarinas, GW471552 e GW471558, foram estudados em modelos experimentais de candidíase vulvovaginal em ratas imunossuprimidas com dexametasona diluída em água. Candidíase vulvovaginal foi estabelecida em ratas estrus ovariectomizados e estrus por inoculação intravaginal com 10^7 UFC de *C. albicans* 4711E em 0,1 mL de salina, GW471552 e GW471558 foi administrado a 1,5 e 10mg/kg de peso do corpo por via subcutânea, 1º dia após tratamento. A atividade antifúngica de azasordarina foi avaliada através da contagem de colônia e exame histológico. Contra infecção vulvovaginal, ambas comparações mostraram eficácia terapêutica significativa. GW471552 foi capaz de eliminar a carga de fungo vaginal na dose de 10mg/kg e reduziu significativamente o número de UFC de *C. albicans* na vagina de ratas tratadas com a dose de 5mg/kg ($P<0,05$). GW471552 mostrou maior eficácia, eliminando a carga do fungo em 100% de ratas infectadas na dose de 5mg/kg e reduzindo significativamente ($P<0,05$) a contagem regular de *C. albicans* na vagina até a dose de 1mg/kg, os achados histológicos confirmam os

resultados microbiológicos. O estudo demonstrou que as azasordarinas testadas são efetivas contra candidíase vulvovaginal em ratas imunossuprimidas e podem ser agentes antifúngicos promissores para uso humano.

3.9 TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

As drogas antifúngicas podem ser divididas em duas categorias: drogas que afetam a membrana celular e drogas que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como a síntese de ácido desoxirribonucléico, ácido ribonucléico ou proteínas (Sobel, 1990; Trabulsi, 1999).

O tratamento para combater candidíase vulvovaginal é feito à base de antimicóticos, mas deve-se tentar tratar as causas de candidíase para evitar as reincidiva. O tratamento de candidíase vaginal é feito com medicamentos eficazes, tomado por via oral em dose única ou de uso tópico local. Os objetivos da terapia das infecções vaginais fúngicas são o alívio dos sintomas e a erradicação da infecção, ou seja, a cura do paciente e o restabelecimento da microbiota vaginal normal. Contudo, uma pequena porcentagem de pacientes pode experimentar infecções recorrentes e persistentes, o que irá requerer uma terapia mais prolongada ou doses mais altas de medicação (Shimp, 2002).

Moraes (1996a) em seus estudos sobre imunoterapia como tratamento de candidíase vaginal de repetição têm sido utilizados em pacientes, encaminhados pelo ginecologista depois de esgotados os recursos terapêuticos habituais. Estudo prospectivo de 3 anos e meio foi realizado com 42 pacientes, as quais se propôs um tempo de 24 meses de tratamento, o qual mostrou eficácia de 64,3%, com redução significativa no número de episódios de candidíase por ano. Mostrou também que pelo menos 40% dessa pacientes aderiram aos dois anos de imunoterapia, que a maioria cumpriu apenas a metade do tempo previsto inicialmente. Essa modalidade terapêutica é um recurso a ser bem considerado em pacientes refratárias aos tratamentos convencionais, especialmente naquelas com história pessoal e familiar de atopia.

Uma variedade de agentes antifúngicos estão disponíveis para o tratamento de candidíase vulvovaginal, incluindo fluconazol, cetoconazol e itraconazol. Entretanto, algumas preocupações existem a respeito da segurança do uso de cetoconazol associado a longo prazo e questões emergem da resistência de *Candida* a fluconazol, os quais

foram relatadas em alguns sub grupos de pacientes. O itraconazol tem provado eficácia no tratamento das infecções de mucosa por *Candida* (Del-Rosso et al. 1998).

Para comparar três regimes de tratamento de candidíase vaginal, foram selecionados um total de 150 mulheres com evidência clínica e micológica de candidíase vaginal, destas 50 receberam aleatoriamente uma dose de 200mg de itraconazol durante 3 dias, 50 dose única de 15mg de fluconazol oral e 50 dose diária de 100mg de clotrimidazol intravaginal por 6 dias. Os resultados foram avaliados previamente entre 5 e 15 dias e posteriormente após 30–60 dias. Na avaliação em curto ou longo prazo, as espécies de *Candida* foram completamente erradicada da vagina em 74% do grupo tratado com itraconazol oralmente durante 3 dias, 70% no grupo com fluconazol com dose única oral e 60% no grupo de clotrimazol intravaginal, respectivamente. A taxa de eficácia clínica foi de 88% nos grupos tratados com itraconazol, 76% no grupo com fluconazol e 58% no grupo tratado com clotrimazol intravaginal. Nenhum grupo apresentou efeitos colaterais relacionados ao tratamento. Assim confirma-se a eficácia terapêutica de candidíase vaginal com itraconazol ou fluconazol oral (Mikamo et al. 1998).

Candido et al. (1999) afirmam que candidíase vaginal continua sendo uma causa comum nas mulheres com corrimento vaginal, prurido e com outras queixas. Embora os numerosos agentes antimicóticos que estão disponíveis para tratamento das vaginites provocadas por leveduras, existem poucos dados comparativos com a atividade *in vitro* dessas drogas. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar espécies de *Candida* na vagina e no ânus de pacientes tratadas em uma clínica de ginecologia, bem como determinar a susceptibilidade a compostos azólicos avaliados pelo método do E-teste. Os esfregaços vaginais e retais foram coletados de 80 pacientes não grávidas com idade entre 18-59 anos, com atividade sexual, com e sem vaginite. Foram utilizados os métodos tradicionais para a detecção de leveduras patogênicas. A susceptibilidade dos isolados ao fluconazol, cetoconazol e ao itraconazol, foi medida pelo método de difusão em ágar (E-teste), usando o meio de RPMI 1640 com 2% de glicose e tampão fosfato. Foram isoladas 33 espécies de *Candida* de 17 pacientes, em proporções similares de ambos locais anatômicos. Das 17 pacientes, em 12 foram identificadas 24 amostras de *C. albicans* no trato vaginal e retal. A susceptibilidade dos isolados ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol, mostrou que 21% das amostras de *C. albicans* foram resistentes ao cetoconazol, 54% foram resistentes a itraconazol e nenhuma foi resistente

ao fluconazol. A sensibilidade dos isolados foi similar, independentemente do sítio anatômico, indicando que estas amostras são do mesmo fenótipo.

Edelman e Grant (1999) estudaram a redução de custos com terapia, esta tem sido desenvolvida para os principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento de candidíase vaginal, incluindo clotrimazol, econazol, isoconazol, miconazol, terconazol e fluconazol. Uma busca na literatura médica identificou 14 estudos que compararam terapias de dose única para candidíase vaginal em mulheres não grávidas. Esses estudos, realizados com metodologias semelhantes, forneceram informações suficientes para avaliação clínica e para a taxa de cura micológica. Houve poucas diferenças significativas entre dados clínicos ou a taxa de cura micológica na terapia de dose única, e nenhuma terapia foi consistentemente melhor que qualquer outra, assim até que novas informações estejam disponíveis, a escolha da terapia continuará sendo baseada na preferência clínica individual.

C. albicans é uma realidade clínica, mais ou menos evidente em pessoas saudáveis, devido a várias razões, diminuição de proteções imunológicas, assim esta espécie pode torna-se patológica em diferentes localizações do corpo: boca, áreas da pele ou região vulvovaginal. Foram selecionadas 135 pacientes, tratadas por uma droga antimicótica original (Tratamento P) ou alternativamente com base em uma lista aleatória de antimicóticos comumente usado no mercado (tratamento M). Ambos tratamentos foram em forma de ducha vaginal e o tempo de tratamento foi planejado durante o período de 8 dias, e em qualquer caso até a cura dos sintomas. A análise estatística dos dados coletados mostrou os seguintes resultados: nas duas subamostras de tratamentos P e M as drogas antimicóticas demonstraram uma eficácia sobre vários sintomas durante o período terapêutico, com boa tolerabilidade, contudo o tratamento P mostrou um desempenho ligeiramente melhor em alguns parâmetros selecionados, sendo este sugerido como um novo agente antimicótico (P) (Scupilliti et al. 1999).

Estudo comparativo usando um modelo duplo-cego aleatório foi utilizado para avaliar a eficácia de clotrimazol contra flutrimazol, para o tratamento de candidíase vulvovaginal aguda. Ambas as drogas foram administradas em dose única de comprimido vaginal contendo 500mg da droga e creme tópico diariamente duas vezes por 7 dias. Todas as pacientes com mais de 18 anos tinham candidíase vaginal ou vulvovaginal aguda, evidenciado pelo exame clínico e confirmado com exames direto e de cultura. Todas as pacientes foram examinadas antes do tratamento, de 9 a 10 e 25 a

31 dias no começo e após o tratamento. Das 107 pacientes incluída no início da pesquisa, 101 completaram o tratamento corretamente, 53 no grupo tratado com clotrimazol, 48 no grupo com flutrimazol nos primeiros 9 a 10 dias. A taxa de cura micológica foi de 78,9% no grupo tratado com clotrimazol e 87,5% no grupo com flutrimazol. No segundo momento (25 a 31 dias), a taxa de cura foi de 86,8% no grupo tratado com clotrimazol e 95,8% no grupo com flutrimazol. As diferenças entre os grupos em relação a taxa de cura não foi estatisticamente significativa. Na maioria dos casos a cura micológica foi associada com o desaparecimento dos sintomas. Foram observados efeitos adversos nas pacientes em uma porcentagem muito pequena, e em todos os casos foram mínimos. Concluindo que comprimido vaginal de dose única de clotrimazol e flutrimazol mostram alta eficácia, similaridade na resposta terapêutica, assim como tolerabilidade de pacientes no tratamento de candidíase vulvovaginal aguda (Amrouni et al. 2000).

Czaika et al. (2000) reincidiva crônica de candidíase vulvovaginal é uma problemática diagnóstica na enfermagem ginecológica e dermatológica. Prognóstico e terapia são primariamente determinados pelo microrganismo causal e pela interação da espécie fúngica com o agente antifúngico atualmente disponível.

Moraes et al. (2000) avaliaram a eficácia de imunoterapia em alérgeno de *C. albicans* em mulheres com teste de pele positivo para este fungo. Sendo conduzido um estudo prospectivo pela técnica Cohort em 34 mulheres, com idade média de 33,5 anos, variando 18 a 57, com reincidiva de candidíase vaginal referido por ginecologista a um alergologista. Todas as pacientes tinham cultura vaginal positiva para *C. albicans* e foram indiferentes a outro modo de tratamento. A estas mulheres foram oferecidas à opção de imunoterapia alérgica com *C. albicans* durante um período de 24 meses. A eficácia da terapia foi avaliada por 33 meses, as quais foram tratadas com injeções semanais de extrato alérgico de *C. albicans* no período de $17,4 \pm 7,2$ meses (4 a 24 meses). Vinte e duas mulheres tiveram melhora nos sintomas, em nove pacientes (26%) ausência de episódios agudos durante 2 anos, 13 pacientes (38%) respostas parciais, como diminuição no número e intensidade dos episódios. No geral, 64% das pacientes melhoraram, onze pacientes não mostraram nenhuma melhora e pioraram. Os efeitos foram evidentes após 2 a 12 meses de terapia (média 3,5 meses). A incidência média de episódios de vaginite por ano diminuiu de $8,5 \pm 2,6$ a $3,6 \pm 4,3$ ($p=0,000$). O estudo também mostrou que a maioria das pacientes são atópicas (70%), tinham rinite alérgica

(67%) e história familiar de alergia (70%). Os resultados sugerem que em um subgrupo de pacientes com reincidência de candidíase vaginal, a imunoterapia alergênica com *C. albicans* diminuiu o número e intensidade de episódios.

Pacientes que se autodiagnosticam de infecção por levedura, arriscam perder outras etiologias concorrentes, envolvendo dois ou mais organismos que requerem diferentes tratamentos, pois algumas patologias têm sintomas similares a *Candida*. Cuidado deve ser tomado então para assegurar que o prurido não seja devido ao herpes simples, alergias, dermatite de contato ou psoríase. É importante assegurar que o corrimento vaginal não seja devido à tricomoníase, vaginose bacteriana, *Clamidia* ou infecção gonocócica. Além disso, o profissional médico não espera encontrar bolhas genitais, dores abdominais, febre, sangramento irregular ou queixas de dor em um paciente com candidíase vulvovaginal (Ringdahl, 2000).

Bauters et al. (2002) estudaram com propósito de determinar a prevalência de colonização vaginal por *Candida* utilizando um método de detecção rápido, para examinar as determinantes de candidíase vaginal e avaliar a susceptibilidade ao fluconazol. Swab vaginal foram coletados de mulheres selecionadas da clínica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Foi feita uma diferenciação entre pacientes com exame de KOH negativo e positivo. Os resultados foram realizados com 612 mulheres, 39 (6,3%) com diagnóstico de candidíase clínica. A taxa global de colonização de levedura foi de 20,1% e *C. albicans* foi a mais frequentemente isolada (68,3%). Susceptibilidade ao fluconazol *in vitro* foi testada com o método padronizado pelo Comitê Nacional para Laboratório com 21,1% dos isolados resistentes.

Ocorrência ampla de infecção de mucosa causada por *Candida*, em particular candidíase vulvovaginal recorrente entre mulheres de idades férteis, tratadas com fungicidas, tem aumentado o número de investigações com relação a imunoterapia de vaginite por *Candida*. Esta pesquisa discute três diferentes abordagens experimentais demonstrando ser potencialmente transferido para doença humana: o uso de anticorpos contra enzimas ou adesinas bem definida na superfície celular; a geração de toxina “Killer” *Candida* e a geração de vacinas terapêutica e imunomodulatória (Magliani et al. 2002a).

Novas estratégias para tratamento de candidíase vaginal têm sido recentemente exploradas, devido à ocorrência generalizada desta doença, em particular como infecções recidivantes, limitações seguras e eficácia antifúngica, bem como a falta de

abordagem preventiva. Foram discutidas novas estratégias com quimioterápicos e imunoterápicos, baseado no entendimento de imunopatogênese na prevalência da infecção humana. O papel dos anticorpos assassinos ou seus derivados moleculares, como por exemplo, anticorpos que mostram atividades antibióticas na parte interna da levedura da toxina assassina, caracterizada por um amplo espectro de atividade microbiana, e o receptor da parede celular específica da levedura, como novos agentes terapêuticos e vacinas preventivas ou terapêuticas (Magliani et al. 2002b).

A incidência comparativa de candidíase vaginal sintomática tratada com pivimecilina e norfloxacina em mulheres sintomática aguda foi determinada aleatoriamente em ensaio clínico duplo-cego. Presença de vaginite por *Candida* foi baseada na presença de sintomas específicos, tais como prurido genital e/ou a prescrição de terapia específica anti-*Candida* foram as seguintes: Estudo 1 pivimecilina 200mg oferecida durante 7 dias 13 (4,6%), pivimecilina 200mg durante 7 dias 7 (2,4%), pivimecilina 400mg durante 3 dias 6 (2,1%) e placebo 6 (2,1%) $P=0,19$. Estudo 2 pivimecilina 400mg durante 3 dias 7 (1,5%), norfloxacina 400mg durante 3 dias 20 (3%) $P=0,016$. A incidência de vaginite por *Candida* em mulheres sintomáticas aguda após 3 dias de tratamento com pivimecilina 400mg é similar àquela com placebo e significativamente menor do que a incidência com norfloxacina 400mg durante 3 dias (Menday, 2002).

Segundo Passos et al. (2002) corrimento vaginal é uma queixa frequente nos serviços de ginecologia. Dessas queixas, as infecções por vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase são as mais prevalentes. Vários microbicidas estão sendo testados e os a base de cloro possuem história e ação potente. O objetivo foi isolar os principais microrganismos envolvidos em infecções vaginais, testar a eficácia terapeuta de solução com hipoclorito de sódio em aplicação vagina, comparando os resultados com grupo placebo.

Estudo ao acaso comparou a eficácia e tolerabilidade de dois anti-sépticos vaginal em 180 pacientes com infecções vaginais de etiologia variada (vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e tricomoníase), as quais foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos tratadas com 10mg cloreto de dequalinium (CAS 522-51-0, fluomicina N (R)) e 200mg iodo de povidona (CAS 25655-41-8) uma vez por dia durante 6 dias. Exames de controle aconteceram no 5º e 7º dias após o fim do tratamento, e 3 a 4 semanas após o primeiro exame controle. A quantidade de sintomas

totais é sumarizada pela quantidade de sintomas clínicos, corrimento, queimor, prurido, vermelhidão da vulva/vagina, definidos como parâmetros eficazes primários. Ambos os tratamentos melhoraram fortemente os sintomas de infecção vaginal a curto e em longo prazo. Análise descritiva dos parâmetros secundários, pH vaginal, grau de pureza da microbiota vaginal e número de lactobacilos confirma a eficácia com ambas terapias para restabelecer a microbiota vaginal. Os resultados da análise de eficácia da avaliação dos antifúngicos foram muito bons em 70%-90% dos casos, com boa tolerabilidade de ambas preparações indicadas pelo baixo número de efeitos adversos (Petersen et al. 2002).

Yano et al., (2014) objetivaram determinar a influencia de *alarmin* S100A8 na resposta de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) *in vitro*, avaliando os receptores de reconhecimento padrões (PRRs). Os resultados revelaram que, de acordo com dados relatados anteriormente *in vitro*, derivados eucarióticos S100A8 induz quimiotaxia PMN significativamente *in vivo*. Por outro lado, a falta de *alarmin* S100A8 biologicamente ativa não teve nenhum efeito na resposta de PMN, *in vivo*. As análises de PRR, Toll-like receptor 4 (TLR4) e SIGNR1 em células epiteliais vaginais mostrou uma redução dramática por *C. albicans* na indução S100A8/S100A9 RNAm *in vitro*. Concluíram que estes resultados sugerem que *alarmin* S100A8 é suficiente, mas não necessário, para induzir a migração de PMN durante a CVV e que a resposta vaginal PMN para *C. albicans* envolve PRRs além de SIGNR1 e TLR4, ou outras vias de indução.

Elizondo-Zertuche et al., (2014) estudaram a eficácia de ravuconazol em um modelo murino de vaginite por *Candida albicans*. Eles objetivaram comparar a eficácia de ravuconazol e fluconazol no tratamento de vaginite por *C. albicans*. Foi realizado testes de suscetibilidade *in vitro* de 40 isolados, uma cepa resistente a fluconazol (CIM de > 64µg / ml) foi selecionada para o estudo *in vivo*. Para o tratamento utilizaram os regimes de 1, 5, 10, e 20mg/Kg uma vez aor dia de ravuconazol; 20mg/Kg duas vezes ao dia de ravuconazol; 20mg/Kg uma vez ao dia de fluconazol; e 20mg/Kg duas vezes ao dia de fluconazol. Regimes de fluconazol ou ravuconazol na dose de 20mg/Kg duas vezes ao dia eram mais eficazes para reduzir a carga de *C. albicans* resistente ao fluconazol do que a administração de dose única. Os autores concluem que a erradicação de *C. albicans* a partir da vagina não foi observada com o tratamento no modelo animal, embora o tratamento de ravuconazol mostrou uma concentração inferior

de fungos 14 dias após a administração da droga.

Nos estudos de Zhang et al., (2013) verificaram a gravidade da infecção de CVV em ratos por medida qualitativa, na contagem de colônias e pontuação histopatológica. No procedimento experimental utilizaram ratos BALB/c com idades entre 8 a 10 semanas. Os três grupos experimentais foram separados de forma aleatória, e receberam doses hormonal, por 3 dias antes da inoculação vaginal. A infecção se deu por via intravaginal com 10µl (5×10^4) de suspensão de *Candida albicans*, os animais controles, foram inoculados 10µl de solução salina. O exame direto, a contagem de colônias e o histopatológico, foram realizados 3, 7 e 14 dias após a inoculação. Identificaram que o tratamento com estrogênio aumentou a carga fúngica vaginal e extensão da infecção e inflamação em comparação com o grupo controle. Contagem de colônia atingiu o pico no terceiro dia e diminuiu após 7 dias. Já a pontuação de infecção aumentou gradualmente durante os primeiros 7 dias e diminuiu no décimo quarto dia, enquanto a extensão da inflamação aumentou progressivamente ao longo de 14 dias. Concluíram que esse estudo demonstra que o sistema de pontuação histológico pode ser mais viável do que a contagem de colônias para avaliação da infecciosidade e da mudança dinâmica na candidíase vaginal experimental.

A capacidade de tolerar a *Candida albicans* implica que os mecanismos de defesa do hospedeiro e a tolerância de resistência cooperam para limitar a carga fúngica e inflamação. Estudaram a ação de IL-22 e IDO1 com a imunidade e tolerância candidíase vaginal em modelo murino. Onde foram avaliadas a resistência e a tolerância ao fungo em candidíase experimental e também humana, bem como em CVVR. Os mecanismos de resistência e tolerância foram ativados em CVV murino, envolvendo IL-22 e as células T reguladoras IL-produzindo-10, respectivamente, com uma grande contribuição pela indoleamine enzima 2,3-dioxigenase 1 (IDO1). IDO1 era responsável pela produção de kynurenines tolerogénicos, de tal modo que a terapia de substituição com kynurenines restaurados imunoproteção para CVV. Em humanos, duas variantes genéticas funcionais em IL22 e IDO1 foram identificados e associados com resistência aumentada a CRVV, e correlacionados com aumento da expressão local de IL-22, e IDO1 kynurenines. Concluíram que IL-22 e IDO1 são cruciais para equilibrar resistência com tolerância à *Candida*, suas deficiências são fatores de risco para CRVV, e visando tolerância via kynurenines terapêuticas podem beneficiar pacientes com CVVR (De Luca et al., 2013).

Mosci et al., (2013) estudaram as cepas-dependentes na sensibilidade de estrogênio durante a candidíase vaginal em ratos. Nesse caso, os modelos animais disponíveis para estudar a resposta imune à infecção do trato genital requerem indução de um estado pseudo-estro, geralmente obtidos através da administração de estradiol. Assim foram utilizados diferentes linhagens de camundongos. Na fase precoce da infecção em CD1, C57BL/6, BALB/c albinos foram colonizados para níveis semelhantes, enquanto que na fase tardia de infecção, o BALB/c, que são considerados geneticamente resistentes a infecção por *C. albicans*, apresentaram maior suscetibilidade à candidíase vaginal do que CD1 e C57BL/6. Isso aconteceu porque estradiol induzido deixa os úteros cheios de líquido, mais relatado em camundongos infectados e mais evidente em BALB/c e camundongos C57BL/6 do que em CD1. Ao contrário de CD1, BALB/c e C57BL/6 mostraram uma alta colonização fúngica do útero. A presença de *C. albicans* na vagina e no útero foi acompanhada por uma carga bacteriana. Essas observações levaram os autores a realizar uma análise cuidadosa dos efeitos do estradiol em um modelo de infecção vaginal animal.

Rossi et al. (2012) estudaram a utilização terapêutica de um péptido antimicrobiano obtido da aranha *Acanthoscurria gomesiana* no controlo de candidíase vaginal experimental. Os animais foram infectados com *C. albicans* e tratados com “gomesina”. *Candida albicans* teve seu crescimento reduzido nos rins, baço, fígado e na vagina de camundongos infectados. Marcadores com Technetium-99 m mostraram que o péptido é capturado nos rins, baço e fígado; aumentando a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-6 detectada em animais infectados e tratados com a gomesina, sugerindo uma actividade imunomoduladora. Além disso, os ratos imunossuprimidos e os infectados por *C. albicans* mostraram um aumento na sobrevida após o tratamento em associação de gomesina e fluconazol. Com base neste trabalho, os autores concluem que Gomesina provou ser eficaz contra a infecção de *C. albicans*. E que pode ser usado como uma terapia alternativa para a candidíase quer seja isoladamente ou em combinação com fluconazol. Contudo o mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Portanto, os dados apresentados neste estudo reforça o potencial de gomesina como um agente antifúngico na terapêutica de CVV.

Rahman et al. (2012) realizaram um modelo murino de colonização oral e vaginal por *Candida albicans* concomitante. Foi determinada como ideal a administração semanal de estrogênio de forma intramuscular (5mg) e subcutânea (5mg)

onde foi constatado um aumento da colonização oral e vaginal. A colonização persistiu por até 6 semanas em ambos os locais em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6). Concluem que este modelo integrado de colonização da mucosa reduz o número de animais experimental pela metade, e abre novos caminhos de pesquisa para estudar as interações patógeno-hospedeiro durante o estado mais natural de *C. albicans*. Consideram a criação de um modelo murino de baixo estrogênio do concorrente oral e vaginal um grande avanço.

Pietrella et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha suaveolens* em uma infecção experimental da candidíase vaginal. A atividade *in vitro* foi avaliada segundo o padrão e métodos do CLSI, e a análise *in vivo* foi realizada por exploração de um novo modelo não invasivo da candidíase vaginal nos animais com base numa técnica de imagiologia *in vivo*. Tiveram como resultados que o óleo apresentou potente ação e atividade em um sistema *in vitro experimental*; somado a um grau de proteção contra a candidíase vaginal em um sistema experimental *in vivo*. Concluíram que pela primeira vez um óleo essencial de *Mentha suaveolens* teve ação “candidastática” e “candidacida”. Sendo esses resultados motivo para novas investigações dos componentes ativos desse extrato na busca de novas terapêuticas no tratamento de candidíase vaginal.

Diante do grande número de mulheres procurando diagnóstico e tratamento para as infecções vaginais e aprovação dos compostos antifúngicos vaginais para o uso sem prescrição médica, é imperativo que os farmacêuticos entendam o gerenciamento terapêutico destas infecções vaginais (SHIMP, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REATIVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DAS CULTURAS DE LEVEDURAS ESTOCADAS NA MICOTECA URM

Foram obtidas culturas de leveduras pigmentadas de interesse biotecnológico depositadas na Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As culturas foram reativadas e autenticadas de acordo com os critérios clássicos de identificação (Kurtzman; Fell, 1998; Barnnet et al., 2000; Hoog et al. 2000), moleculares (Goes-Neto et al. 2005) e espectrometria de massa (Putignani et al. 2011; Veen et al. 2010).

Reativação - Fragmentos das culturas preservadas sob óleo mineral foram transferidos para caldo glicosado e mantidos a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 72h foram semeadas na superfície do meio Sabouraud Dextrose Ágar (Difco) para verificação da viabilidade, avaliada através do crescimento em cultura até o quinto dia do semeio; pureza, analisada em lâminas contendo fragmentos da cultura corados com azul de Aman; e autenticação taxonômica baseado nas características diferenciais das culturas.

Morfologia das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido - as formas das células vegetativas foram verificadas através de lâminas contendo fragmentos da cultura (crescidas em meio ágar Sabouraud) e sobre estes foram depositados 40µl de azul de Aman (lactofenol blue), sendo observadas ao microscópio quanto aos aspectos morfológicos (células esferoidais, subglobulosa, elipsoidal, ovóide, cilíndrica, botuliforme, alongada, apiculada, ogival ou lunata). Para visualização das características das células vegetativas, material de cultura jovem foi inoculado em 30mL de extrato de malte e após 2-3 dias de incubação a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, a cultura foi examinada. O comprimento e a largura das células foram medidas e os valores obtidos da medição de pelo menos 20 células foram determinados.

Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo - para verificação da possível formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporos pelas leveduras, microcultivos, foram realizados através da preparação de lâminas depositando 3 mL de ágar CornMeal mantida em um suporte de vidro (em forma de U) no interior de uma

placa de Petri. Após solidificação do meio, foram semeados fragmentos das culturas em duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. E posteriormente foram mantidas em câmara úmida acrescentando-se 2 mL de água destilada esterilizada na placa durante o período de incubação do teste. A visualização das estruturas através de microscopia foi feita após 24h, 48h e 72h ao termino dos procedimentos.

Assimilação de fontes de carbono (Auxonograma) - para o teste, foram realizadas suspensões de cada espécie de levedura em água com extrato de levedura e a concentração foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, foi realizado *pour plate* em meio isento de carboidratos e após solidificação, foram adicionadas fontes de carbono. O meio foi incubado a 25°C por três dias, sendo realizada leitura a cada 24 horas para verificar se havia formação de halo ao redor das diferentes fontes de carbono testadas. Isto é, crescimento da levedura, indicando a assimilação.

Hidrolise da Uréia - as amostras com até 48h de crescimento foram semeadas em meio Caldo Uréia R/ DIFCO e incubadas a 30°C. Os tubos foram examinados a cada meia hora por até quatro horas a fim de verificar se havia a mudança de cor do meio de amarelo para vermelho, indicando produção de urease.

Autenticação genotípica - a biomassa das leveduras foi obtida a partir de culturas cultivadas em Sabouraud Dextrose Ágar contido em tubos de ensaio, mantidos a 28°C por 120 horas. A massa celular foi retirada do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 ml com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (*glass beads*) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212µm and 425-600µm; Sigma, U.S. sieve), em seguida, o material foi triturado por agitação em alta velocidade em um FastPrep.

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al., (2005), que incluiu uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e posterior homogeneização do material em tampão CTAB 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Para amplificação da região ITS foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram os mesmos descritos por Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR (5µL) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed, e visualizado sob luz ultra violeta - UV. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o *PureLink PCR Purification Kit* (Invitrogen) e encaminhados para sequenciamento.

Identificação proteômica por MALDI-TOF MS - os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex, BrukerDaltonics, Bremen, Germany).

O cultivo e manutenção dos isolados de *Rhodotorula* sp. foram em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *Escherichia coli*, utilizadas como calibrante, foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). Nas análises *Trichophyton rubrum* foi incorporado como um controle externo sendo cultivado em YEPD. Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas antes da análise pelo MALDI TOF MS.

Fragmento de células (cerca de 50µg) foi diretamente transferido do meio de cultura para os anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético (TFA) e levemente misturado. Para *E. coli* a adição da solução matriz foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico. Todas as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (20 $\pm$ 2°C). Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5°C (Putignani *et al.*, 2011; Veen *et al.*, 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5 α com conhecido valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. A identificação através do software Biotyper™ é baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.2 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS DAS LEVEDURAS PIGMENTADAS

Condições de cultivo e obtenção de biomassa - os isolados das leveduras pigmentadas foram cultivados previamente em tubos inclinados contendo meio de cultura à base de dextrose, peptona, extrato de levedura e extrato de malte com pH 5,0. Após 72 horas foi realizado a padronização do inóculo em tubos contendo 1mL de água destilada esterilizada, onde foram adicionadas pequenas porções da cultura, para obtenção da densidade ótica em espectrofotômetro 0,007 de absorbância a 650nm. Em seguida foi adicionado 100 μ L no meio de cultura, para a obtenção da biomassa. A biomassa foi obtida através do crescimento fúngico em meio líquido contendo sacarose, extrato de levedura, sulfato monobásico de potássio, sulfato de magnésio, mantido sob agitação a 120rpm e temperatura controlada a 22°C durante 120 horas seguindo os protocolos adaptados de Weber et al., (2007), Schneider et al (2013) e Sedmak et al (1990). Foram utilizados erlenmeyers esterilizados contendo 100mL de meio de cultura líquido. O experimento foi realizado em triplicata para cada espécie de levedura.

Extração - as células foram colhidas e lavadas com água destilada esterilizada através do processo de centrifugação, o meio de cultura após turvação foi centrifugado em tubos Falcon de 45mL a 4000rpm até a retirada de todo o meio de cultura. As células foram liofilizadas para à partir da biomassa seca ser iniciado o processo de extração dos metabólitos.

Com o intuito de romper a parede celular das leveduras, foi empregada a metodologia descrita por Sedmak *et al.* (1990), com modificações. Assim, foi utilizado DMSO, 2,5mL para cada 50mg de levedura liofilizada, mantida em agitador magnético a 50°C por 5 minutos para potencializar o efeito do solvente sobre a parede celular. Em seguida, toda a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos para a separação de fases. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado mais 100mL de acetato de etila, sendo esse processo repetido até uma extração exaustiva. Para descarte da parte inorgânica, o material foi transferido para um funil de separação e adicionada água destilada para separação das fases. O extrato resultante de todo o processo de separação foi colocado em balão e levado para rotaevaporador ($T < 35^{\circ}\text{C}$) para total evaporação do solvente, seguido de completa evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio até formação de um filme de cor alaranjada ao redor do balão. Para a limpeza e retirada do extrato do balão, o mesmo foi lavado com pequenas quantidades de acetato de etila até total retirada do filme e transferido para tubos em fluxo contínuo para total evaporação do solvente.

Identificação por espectrometria de massa (CG-MS) das substancias das leveduras pigmentadas - os extratos foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Barbosa et al. 2005; Peres, 2002), utilizando-se um aparelho da marca Shimadzu, modelo GC-MS QP5050A, com coluna capilar BPX5 (30m; 0,25mm de diâmetro interno) e nitrogênio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C. Para a coluna a temperatura inicial foi de 40°C por 4 minutos, aumentando até 280°C, com taxa de 4°C/minutos e permanecendo nesta temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema CG-MS foi de 280°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons entre o intervalo de 30 a 600 Da. A identificação dos compostos foi realizada de acordo com o tempo de retenção e através de comparação dos espectros de massas onde foram caracterizados por índice de similaridade (SI) com aqueles existentes no banco de dados, foram considerados apenas SI acima de 90%.

4.3 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* foram realizados de acordo com o método da microdiluição em caldo, seguindo o documento M27-A3 do *Clinical*

Laboratory Standard Institute. Nos ensaios foi incluído *Candida tropicalis* ATCC 750 como cepa controle com as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) previamente conhecidas para anfotericina B e fluconazol (CLSI, 2008).

Antifúngicos, bioproduto e meio de cultivo - inicialmente, foram preparadas as soluções-estoque dos polímeros anfotericina B (Bristol-Meyer Squib) e nistatina (Bristol-Meyer Squib), bem como do bioproduto utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO). Para o triazol fluconazol (Pfizer) a diluição ocorreu em água e a concentração final foi de 5.000µg/mL.

O meio de cultura utilizado foi Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio adquirido na forma de pó, pH 7,0 ±0,1. O preparo ocorreu em água deionizada, esterilizada na concentração de 46,5g/L e ainda, tamponado com ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS 0,165 mol/L; Sigma-Aldrich). A esterilização foi realizada em filtro biológico (Nalgene Company, Rochester, New York) sendo utilizada membrana de 0,22µm (Milipore, Darmstadt, Alemanha). O meio foi mantido a 4°C e com uso por até três semanas do preparo.

Preparação do inóculo das cepas teste de *Candida albicans* - as leveduras foram crescidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco) mantido a 35°C durante 48 horas. Posteriormente, foram preparadas suspensões dos inóculos em água deionizada, em seguida procedeu-se a esterilização e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (Otto Bier, 1970) em 90% de transmitância em comprimento de onda de 530nm em espectrofotômetro para obtenção do volume do inóculo ajustado para 5,0 mL de solução salina diluído no meio RPMI 1640 para concentração final de $2-5 \times 10^3$ céls/mL.

Ensaio de microdiluição em caldo - a microdiluição foi feita em placas de fundo chato (TPP; Trasadingen, Suíça) com 96 poços e oito séries distribuídos de A a H (vertical), cada qual com 12 poços (horizontal). A partir da solução-estoque das drogas antifúngicas e do bioproduto obtido da cepa da levedura pigmentada, foram preparadas soluções dez vezes a concentração final desejada. Assim, para anfotericina B e nistatina as concentrações utilizadas nos testes foram de 0,03 - 16µg/mL; fluconazol de 0,125 -

64µg/mL e para o bioproduto 2 - 1024µg/mL, em seguida nas placas de microtitulação, foram dispensadas 100µL de cada concentração. Em seguida, estas foram mantidas a - 20°C até o momento do teste, não ultrapassando o período de 30 dias. Nos dias de experimento, as placas foram utilizadas após permanecerem por 30 minutos a 25°C.

Nas diferentes concentrações dos antifúngicos e do bioproduto contidos nos poços das placas, foram colocados o volume de 100µL de suspensões das cepas de *C. albicans* a serem testadas. Os testes foram conduzidos com um controle positivo, contendo nos poços da coluna 12 apenas diluente do antifúngico e solução meio-inóculo e o controle negativo contendo no poço da coluna 11 apenas o meio RPMI 1640. As placas foram mantidas em estufa a 35°C por 48 horas. E após esse período realizada a observação das placas-teste e posterior interpretação.

Interpretação dos Testes - nas leituras, o crescimento no poço controle positivo (poços-colunas 12) foi comparado visualmente quanto a menor concentração capaz de inibir o crescimento em relação as diferentes concentrações testadas (poços de número 1 a 10). Seguindo o protocolo, foram definidas como as CIMs para anfotericina B e nistatina, a inibição de 100% do crescimento, para fluconazol e o bioproduto foi considerado 50% de inibição.

Os critérios para definição de sensibilidade ou resistência foi de acordo com o preconizado no protocolo do documento M27-A3, sendo considerado sensível para anfotericina B e nistatina as cepas com valores de CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$, para fluconazol foi aceito como sensível CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$ e nos casos em as CIMs foram 16 e 32µg/mL, estes foram considerados dose dependente. Os valores de CIM acima dos números citados foram indicados resistentes.

O bioproduto foi avaliado com valores arbitrários devido a falta de padrão para este. Assim, a determinação foi baseada apenas com a menor concentração que apresentasse menos crescimento visível (turbidez).

4.4 MODELO EXPERIMENTAL

Animais - foram utilizadas 30 fêmeas Wistar albinas (*Rattus norvegicus*), com um peso médio de 230g, mantidas em temperatura controlada, umidade e fotoperíodo. As dietas

foram fornecidas de acordo com o peso e água *ad-libitum*. A pré-disposição à candidíase vaginal experimental foi induzido com administração subcutânea de Enrofloxacina® (Fabiani Saude Animal) na dose de 2,5mg/Kg diariamente por dez dias. Após esse período, foi administrado 500mg/mL de Tetramed® (Medquímica) local por mais dez dias.

Inóculo fúngico - após o quinto dia de administração de cada antibiótico, concomitantemente, foi inoculado *C. albicans* crescida em meio SDA por 24h a 30°C e suspensão em tampão fosfato salino (PBS) homogeneizada e ajustada para uma concentração final de 10^6 UFC/mL durante cinco dias. Antes da inoculação, espécimes da cavidade vaginal foram coletados para verificar a presença ou ausência de leveduras.

Desafio experimental e avaliação clínica - uma vez concluído o período de adaptação e pré-disposição dos animais, foi realizada a inoculação por via intravaginal 50 µL de inóculo da suspensão utilizando pipeta automática. A presença de *C. albicans* no fluido vaginal foi avaliada para diagnóstico de candidíase vaginal.

Grupos experimentais - tratamentos - as fêmeas foram aleatoriamente designadas em cinco grupos experimentais: G1 (n=06), animais apenas predispostos com antibiótico, como controle negativo; o G2 (n=06) é um grupo predisposto, infectado e tratado com 0,2 ml de solução salina como controle positivo. O G3 (n=06) é um grupo predisposto, infectado e tratado com o bioproduto; o G4 (n=06) é um grupo predisposto e infectado, tratado com anfotericina B e o G5 (n=06) é um grupo predisposto e infectado, tratado com DMSO.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS DE *Rhodotorula*

Culturas de *Rhodotorula* quanto à viabilidade

Os isolados de *Rhodotorula* preservados sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM apresentam-se viáveis. A viabilidade foi verificada através do crescimento a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ das culturas em meio Sabouraud Dextrose Ágar contido em placa (Figura 2). A preservação sob óleo mineral mostrou-se adequada para manutenção dos três isolados de *Rhodotorula*, uma vez que possibilitou manter os isolados viáveis por um período de dois anos. Canhos et al. (2004) e Costa et al. (2009) afirmaram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às cepas quando comparada à repicagem periódica, sendo considerado eficiente para manutenção a médio prazo.

Figura 2: Macroscopia de *Rhodotorula* sp. URM 6687; *Rhodotorula* sp. URM 7040 e *Rhodotorula* sp. URM 6683 com 72h de crescimento a 28°C em meio Sabouraud Dextrose ágar.



Fonte: NUNES SILVA, 2015.

Taxonomia Clássica

As características fenotípicas espécie-específicas foram mantidas em todos os isolados avaliados e diferentes aspectos taxonômicos puderam ser constatados. O isolado URM 6687 de *Rhodotorula* em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar apresentou colônias em tons de rosa ao vermelho, mucóides, reprodução assexuada por

brotamento, não apresentou filamento, nem pseudohifa. Nos testes bioquímicos não apresentou a capacidade de fermentar carboidratos, não produziu amido, não produziu ácido acético, hidrólise da uréia positiva e reação DBB positiva. Os componentes celulares incluem glicose, galactose, maltose, lactose, rafinose, glicosamina, dentre outros (Tabela 1). Apresentaram crescimento a temperaturas entre 25°C a 35°C, e em meio contendo 0,1% de cicloheximida ocorreu crescimento.

O isolado de *Rhodotorula* URM 6683 apresentou colônias avermelhadas, mucóides, reprodução por brotamento, não apresentou filamentos. Bioquimicamente, não produziu amido nem ácido acético, hidrólise da uréia e reação DBB positiva. Ótimo crescimento a 25°C, mas também pode crescer na faixa de variação de 30 a 37°C, tendo o crescimento inibido a 40°C.

Macroscopicamente, o isolado de *Rhodotorula* URM 7040 apresentou colônias rosadas e mucóides, reprodução unicamente por brotamento, apresentou pseudohifas. Hidrólise da uréia e reação DBB positiva. Quanto ao crescimento em diferentes temperaturas, as espécies do grupo *Rhodotorula* apresentaram crescimento semelhantes com exceção do isolado URM 6687 que não foi capaz de crescer a 37°C (Tabela 2).

Figura 3: Microscopia da cultura de URM 6687 (A), URM 6683 (B) e URM 7040 (C); com 72 horas de crescimento em meio Sabouraud Dextrose Ágar, coradas com lactofenol azul de algodão.

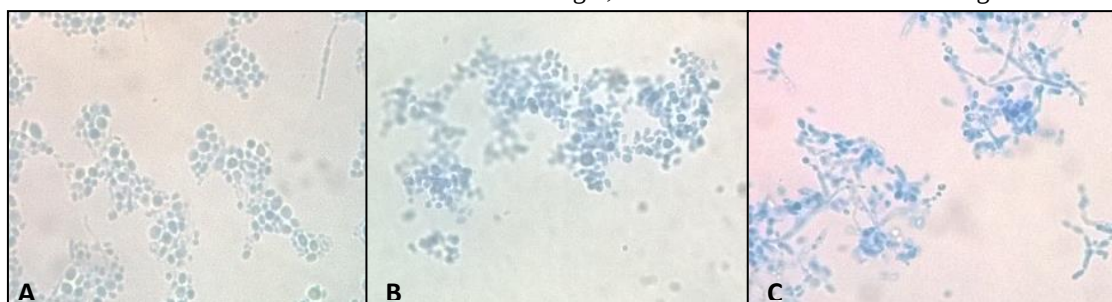


Figura 4: Isolado URM 6683 de *Rhodotorula*: (A) Assimilação de fontes de carbono (G-galactose, D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L- lactose, S-sacarose, T-trealose); (B) nitrogênio (S-sulfato de amônio, N-nitrato de potássio) e (C) hidrólise de ureia positiva.

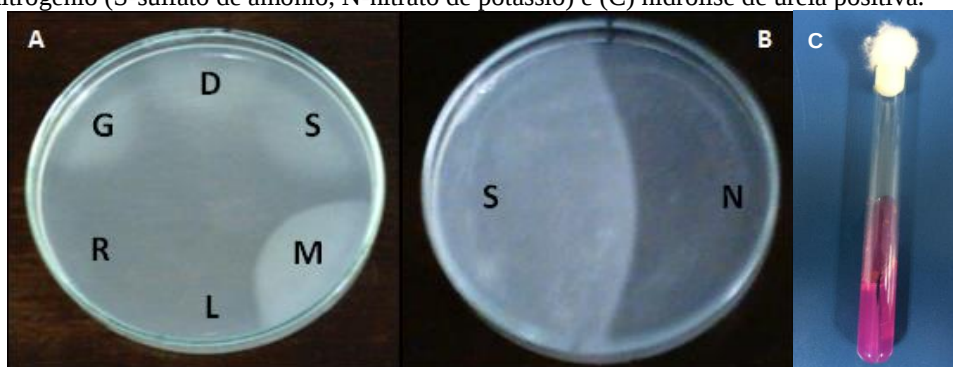


Tabela 1: Testes de identificação por meio de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio das espécies de *Rhodotorula*.

Fontes de Carbono e Nitrogênio	URM 6687	URM 6683	URM 7040
Arabinose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Glucosamina	+	-	-
Hidrólise de Ureia	+	+	+
Inositol	-	-	-
Inulina	-	-	-
Lactose	+	-	-
Maltose	-	+	+
Manitol	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Metil- α -D-glucose	+	+	+
Nitrato	+	-	+
Nitrito	+	+	+
Rafinose	+	-	+
Sacarose	+	+	+
Trealose	+	+	+
Xylose	+	+	+

(+) Positivo, (-) Negativo

Tabela 2. Crescimento de espécies de *Rhodotorula* em diferentes temperaturas

Leveduras pigmentadas	Temperaturas de crescimento (°C)						
	25°C	30°C	35°C	37°C	40°C	42°C	45°C
URM 6687	+	+	+	-	-	-	-
URM 6683	+	+	+	+	-	-	-
URM 7040	+	+	+	+	-	-	-

(+) Positivo, (-) Negativo

Identificação molecular

As culturas de *Rhodotorula* foram avaliadas através do sequenciamento das regiões ITS1, 5.8s e ITS2 do DNA ribossomal dos isolados URM 6687, URM 6683 e URM 7040, e realizada busca por máxima identidade no programa Blastn do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Todas as sequências geradas mostraram similaridade de 99% com *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (NR_073296), sequência proveniente do material tipo da espécie. Assim, com base nos resultados, todos os isolados estudados pertencem à espécie *R. mucilaginosa*.

Técnicas de amplificação e sequenciamento de regiões do rDNA são consideradas específicas e sensíveis na discriminação das espécies. Segundo Biswas et al. (2001) a aplicação de técnicas moleculares para identificação de espécies de leveduras contribuiu significativamente para a ciência. Estudo realizado por Fell et al. (2000) descreveram sete novas espécies para o gênero *Rhodotorula*, através da identificação molecular utilizando sequências da região D1/D2 do rDNA.

Biswas et al. (2001) estudaram filogenia molecular de *Rhodotorula* e afirmam que a diferenciação das espécies do gênero com base em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas requer, além de uma considerável experiência, tempo e alto custo. Fell et al. (2000) têm apostado na identificação com base em dados moleculares, considerando um método eficaz e de visão integrada do gênero.

Identificação proteômica por MALDI TOF MS

Os resultados da identificação por MALDI-TOF MS das três amostras estudadas estão apresentadas na Tabela 3. Neste trabalho, para as três amostras de *Rhodotorula* foi possível observar os perfis de proteínas através dos espectros (Figuras 5, 6 e 7), as quais caracterizaram os três isolados como *R. mucilaginosa* e este resultado foi confirmado através de testes moleculares como o sequenciamento da região ITS do rDNA.

O método clássico de identificação é demorado, no entanto, atualmente existem novos métodos mais rápidos, onde em poucos minutos após obter um material enriquecido é possível identificá-lo (Pasternak, 2012). Lima-Neto et al. (2014) apresentam o MALDI-TOF MS como uma ferramenta rápida e eficiente nas identificações microbiológicas, sobretudo de leveduras.

O MALDI-TOF MS é uma técnica de ionização utilizada em espectrometria de massa, permitindo a análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas, que tendem

a ser frágeis e se fragmentam quando são ionizadas (Cunha et al. 2006). Atualmente a espectrometria de massa é considerada uma metodologia simples, rápida e de baixo custo aplicada na identificação microbiológica. Possui uma alta sensibilidade e habilidade para pesquisar proteínas em um banco de dados, caracterizando uma grande variedade proteica e organismos bioquímicos. Utilizando esta técnica, conseguimos obter espectros protéicos e identificar de maneira rápida e confiável os isolados de *Rhodotorula*.

A identificação convencional de leveduras pigmentadas está apoiada em características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Contudo, Pavlovic et al. (2014), afirmaram que alguns resultados obtidos durante o processo podem ser ambíguos, devido à variabilidade intraespecífica. Lima-Neto et al. (2014) afirmam que abordagens fenotípicas clássicas são técnicas importantes na identificação microbiológica. Contudo, os autores destacam os elevados erros de identificação em nível de espécie, apoiados em Lockhart et al. (2008); Marklein et al. (2009); Putignani et al. (2011). A técnica de MALDI-TOF MS foi adequada para identificações de espécies de *Rhodotorula*, exibindo alta reprodutibilidade de resultados.

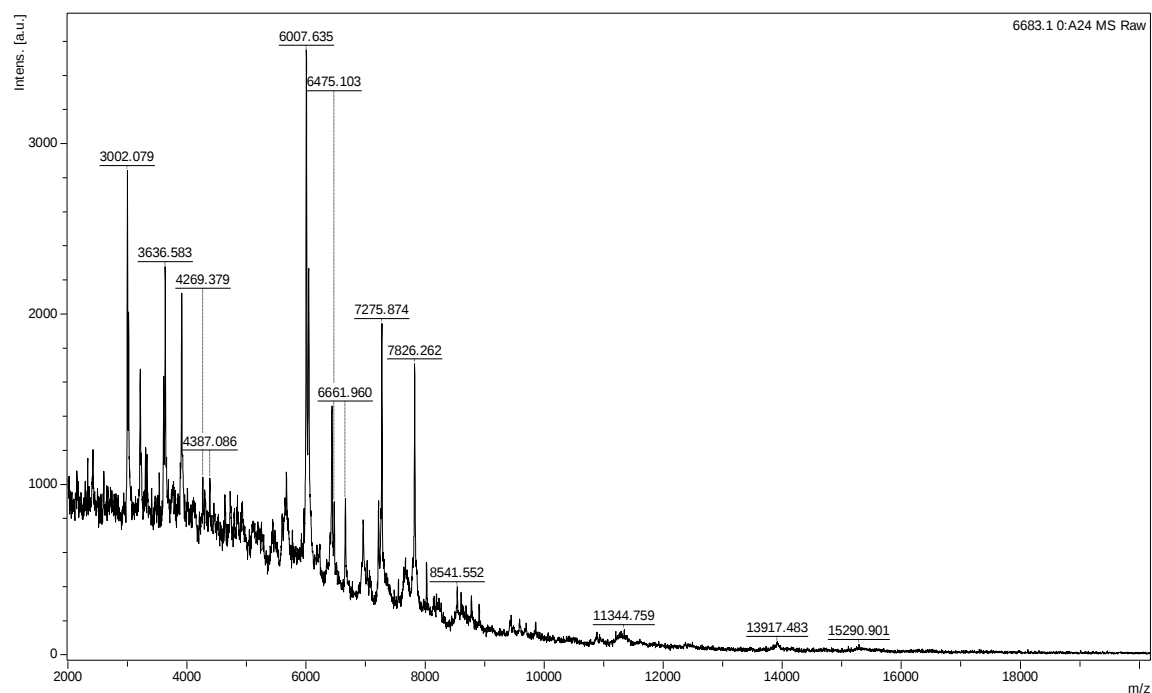
Tabela 3: Resultados fornecidos pelo programa computacional Bruker Daltonik Biotyper.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper
Classification Results



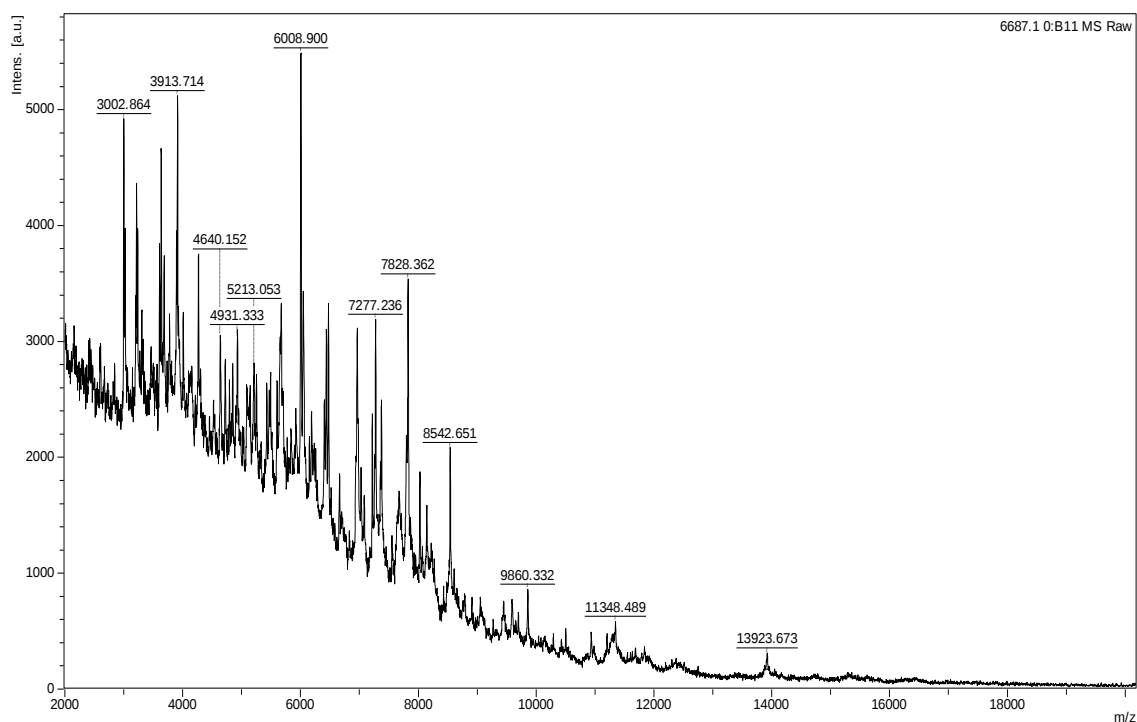
6683.1 (+)(B)	Rhodotorula mucilaginosa	1.976	Rhodotorula mucilaginosa	1.942
6683.2 (++)(A)	Rhodotorula mucilaginosa	2.115	Rhodotorula mucilaginosa	2.089
6687.1 (++)(A)	Rhodotorula mucilaginosa	2.194	Rhodotorula mucilaginosa	2.171
6687.2 (++)(A)	Rhodotorula mucilaginosa	2.215	Rhodotorula mucilaginosa	2.198
7040.1 (++)(A)	Rhodotorula mucilaginosa	2.162	Rhodotorula mucilaginosa	2.052
7040.2 (++)(A)	Rhodotorula mucilaginosa	2.2	Rhodotorula mucilaginosa	2.117

Figura 5: Picos espectrais obtidos de *R. mucilaginosa* URM 6683 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).



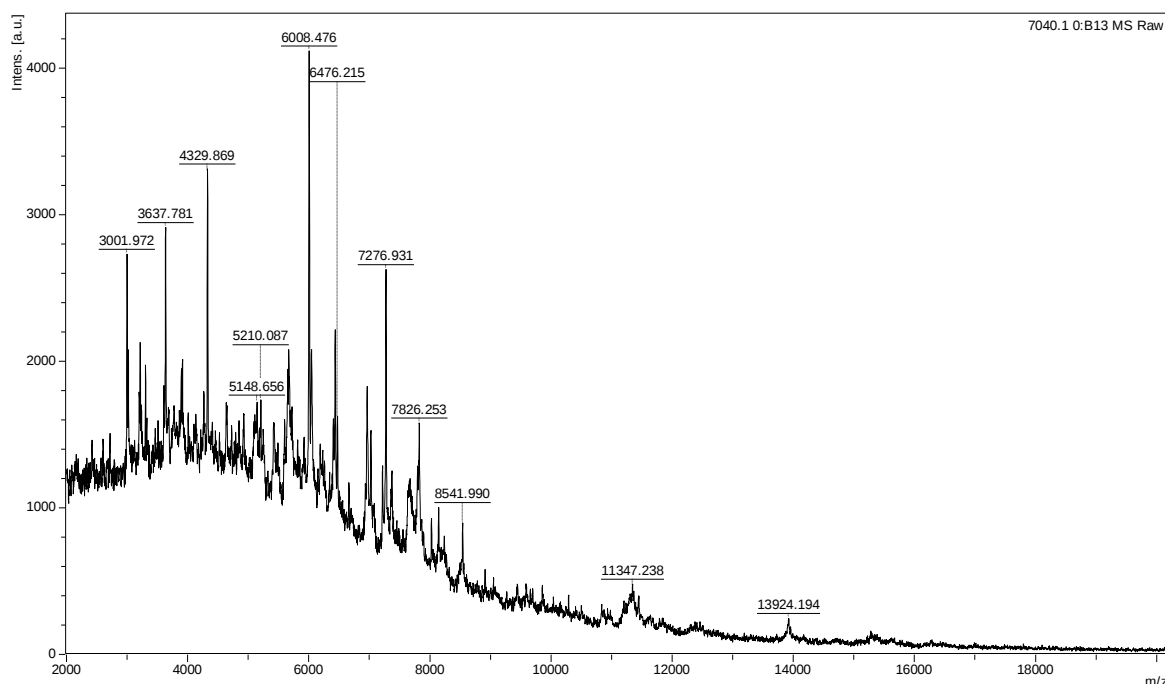
Fonte: MALDI Biotyper

Figura 6: Picos espectrais obtidos de *R. mucilaginosa* URM 6687 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).



Fonte: MALDI Biotyper

Figura 7: Picos espectrais obtidos de *R. mucilaginosa* URM 7040 (espectros MALDI-TOF MS na faixa de 2.000 a 20.000 Da).



Fonte: MALDI Biotyper

5.2 BIOMASSA E EXTRAÇÃO

O crescimento das espécies de *Rhodotorula* ocorreu em meio de cultura líquido sob agitação de 120rpm e temperatura controlada a 25°C durante 120 horas, sendo obtida a massa celular. A biomassa foi recuperada para posterior liofilização e os extratos obtidos a partir da biomassa seca de cada espécie de levedura (Tabela 4).

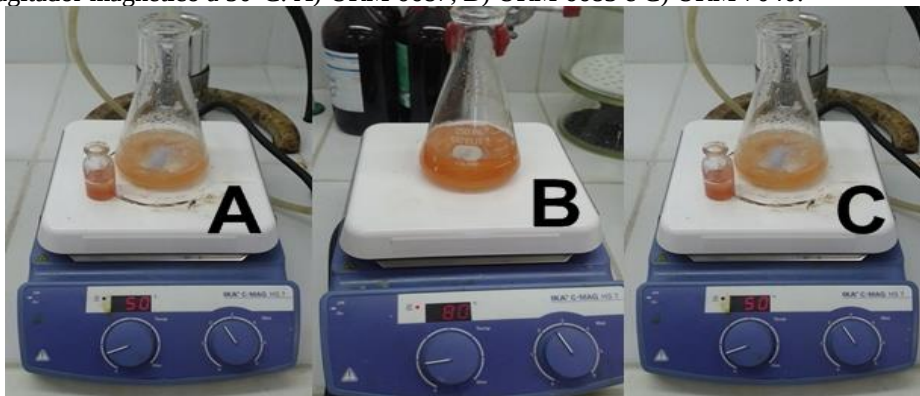
Tabela 4: Peso seco de cada espécie de *Rhodotorula*;

Isolado	Espécie	Peso seco (g)
6687	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	0,676g
7040	<i>R.mucilaginosa</i>	0,856g
6683	<i>R. glutinis</i>	1,557g

A quantidade de biomassa é justificada devido ao método de cultivo em laboratórios através de agitadores horizontais. Porém, para cultivos em grandes proporções se faz necessário o uso de biorreatores como proposto por Yen e Liu (2014), onde indicam ser o mais adequado para leveduras oleaginosas e produção de bioprodutos.

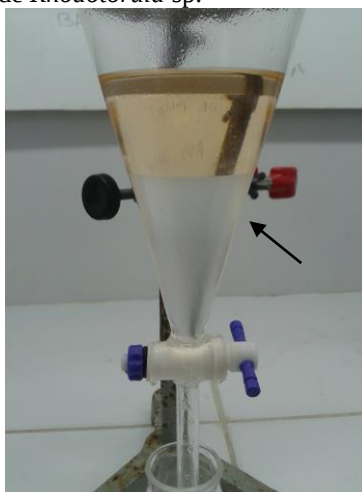
O rompimento da parede celular da levedura foi possível a partir do uso de DMSO, sendo posteriormente liberado as substancias contidas nas células (Figura 8). O extrato orgânico foi transferido ao balão de separação, para retirada dos resíduos do solvente (Figura 9).

Figura 8: Biomassa das espécies de *Rhodotorula* adicionadas de dimetilsulfóxido em agitador magnético a 50°C. A) URM 6687, B) URM 6683 e C) URM 7040.



Fonte: NUNES SILVA, 2015.

Figura 9: Separação da fase aquosa da extração dos componentes orgânicos das células de *Rhodotorula* sp.



Fonte: NUNES SILVA, 2015.

Os resultados obtidos utilizando os solventes hexano e acetato de etila mostraram bons resultados na extração de subprodutos a partir de leveduras. Estes solventes têm ponto de ebulição menor, o que torna mais rápido o processo de evaporação e são relativamente pouco voláteis quando comparado ao uso do DMSO.

Os padrões para uma melhor produção de biomassa são as condições de cultivo, como temperatura, pH e principalmente a fonte de carbono. Varias fontes de carbono já foram testadas por diversos pesquisadores, sendo a glicose a principal, esta proveniente de resíduos orgânicos ou não. A capacidade que *Rhodotorula* sp. tem de poder ser cultivada em diversas fontes de carbono é uma grande vantagem para os largos processos industriais (Marova et al., 2012; Easterling et al., 2009; Akzu e Eren 2007). A exemplo dos resíduos de cerveja que é um adequado substrato de fermentação para a produção de lipídios e de carotenóides por *R. glutinis*, esses efluentes apresentam uma grande quantidade de maltose, fonte de carbono que favorece seu crescimento. Além disso, o controle das condições de cultura como o pH e aeração é um potencializador no crescimento celular (Schneider et al., 2013).

O melhor solvente para extração de bioprodutos de leveduras pigmentadas é o DMSO. Além disso, outros solventes orgânicos, como acetato de etila, hexano, acetona, potencializam o processo de extração. Comumente para a identificação e separação desses lipídios vem sendo utilizado técnicas de HPLC com coluna C₁₈, indicada como ideal, devido a grande variedade de fases móveis. Acoplado a APCI-MS, o método permite a identificação rápida e confiável de pigmentos para a qual os padrões de referência não podem ser facilmente disponíveis, como é o caso para pigmentos de origem fúngica (Weber et al., 2007). Nem sempre uma extração exaustiva é eficaz e completa, contudo devendo ser testados diversos solventes. Nas mais diversas pesquisas o solvente mais bem empregado ainda é o DMSO, muitas vezes associados a outros solventes ou técnicas mecânicas como métodos de agitação por sonicação, facilitando a ruptura das células (Kaiser et al., 2007).

O método de extração de pigmentos através de solventes orgânicos têm resultados positivos. O DMSO, que por sua vez, corrobora no rompimento das macromoléculas associadas e presentes na parede celular fúngica, favorece o processo de extração. O uso associado a outros solventes apolares como éter e acetato de etila ainda revela um bom desempenho na obtenção de lipídios (Park et al. 2007; Passos et al., 2007; Ravazi et al., 2006).

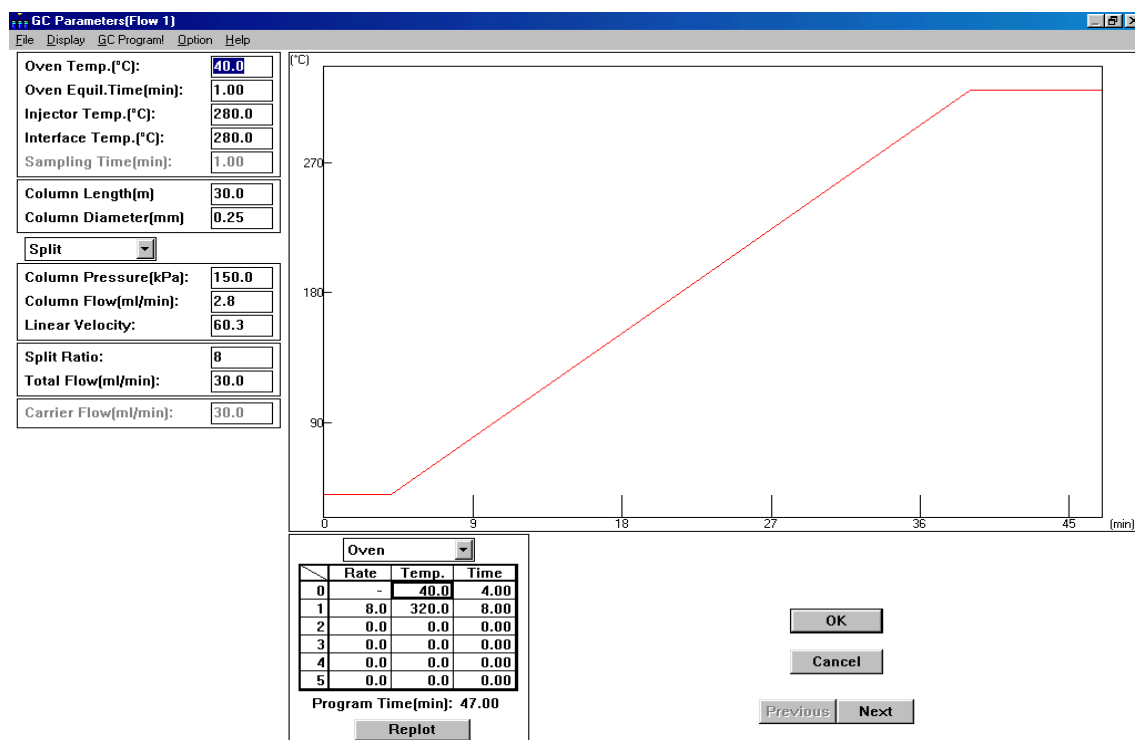
Análise Cromatográfica CG-MS

Para a identificação das substâncias presentes nas amostras de leveduras foi realizada análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-

MS). A técnica de CG-MS, é baseada na partição de componentes entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (Peres, 2002). A análise cromatográfica foi realizada com os parâmetros apresentados na Figura 10, onde possibilitou a obtenção dos picos dos compostos orgânicos presentes nos isolados de *Rhodotorula* URM 6687, URM 6683 e URM 7040.

A espectrometria de massas de armadilha iônica acoplada à cromatografia a gás (GC/MS) tem sido amplamente utilizada na detecção de diversas substâncias, não só para confirmação dos resultados de outras técnicas, mas também como um método independente, sobretudo por sua seletividade e caracterização inequívoca e simultânea dos ativos a serem analisados. Evidenciando a comparação com métodos puramente cromatográficos, visto que estes frequentemente dependem da comparação com padrões via tempos de retenção. Ao contrário, a espectrometria de massas determina os fragmentos iônicos originados da molécula de interesse e os compara com o pico molecular expressado junto a um banco de dados (Sassine, 2002).

Figura 10: Condições cromatográficas utilizadas para análise de lipídios e ácidos graxos.

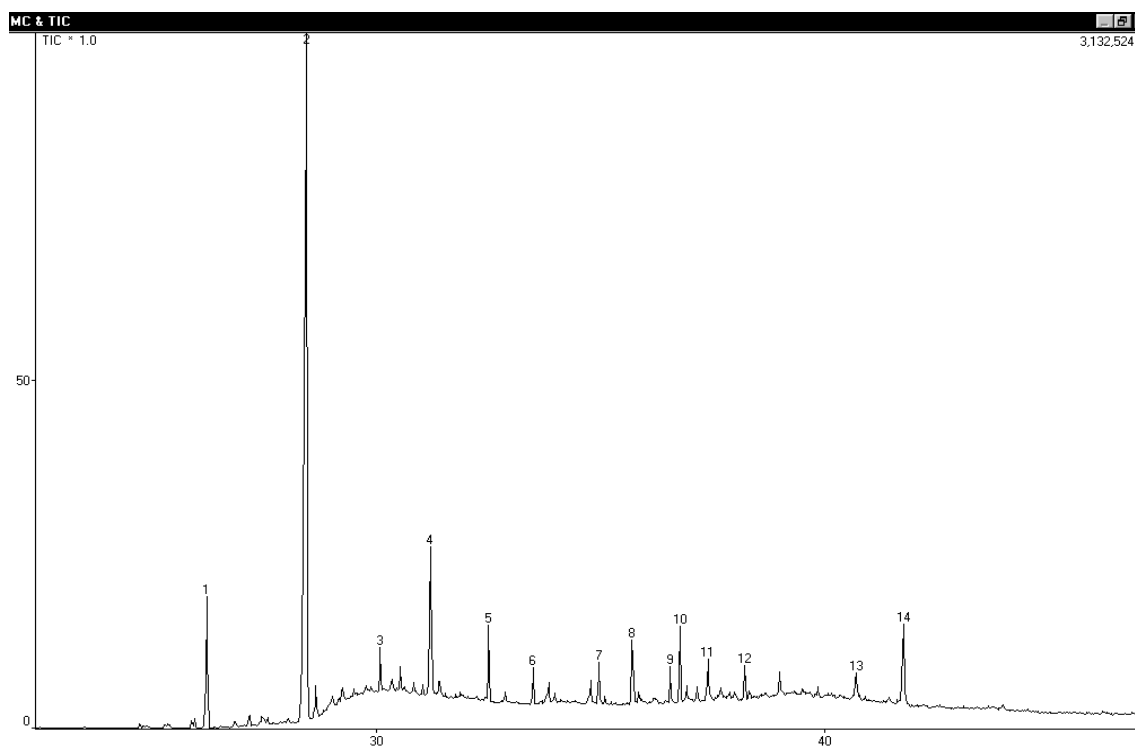


URM 6687

Utilizando-se dos parâmetros estabelecidos foi injetado 5µL do extrato obtido do isolado URM 6687, onde foi observada uma maior concentração de ácido decanóico representado pelo pico 2 no espectro de massa, em seguida o pico 4 representando o ácido oléico (Figura 11). A produção de ácido decanóico conhecido como ácido cáprico foi de 60,01%, onde este tipo de ácido graxo na levedura ainda não foi descrito na literatura neste percentual ligado diretamente a espécie.

Para que haja produção de qualquer bioproduto o microrganismo deve ser submetido a testes com mudanças na composição do meio de cultura, condições de cultivos, aeração, iluminação, tempo de incubação entre outros fatores que podem intervir nos resultados, estudos realizados anteriormente comprovam que vários fatores podem interferir na síntese de lipídios em leveduras a depender das condições de cultivo (Schneider et al., 2013; Easterling et al., 2009; Akzu e Eren 2007). Granger (1993) afirma que vários fatores podem interferir na produção de lipídios, entre estes a proporção carbono:nitrogênio e o *stress* sofrido pelo microrganismo.

Figura 11: Pico espectral identificando ácido decanóico, em isolado de *Rhodotorula* URM 6687.



URM 6683

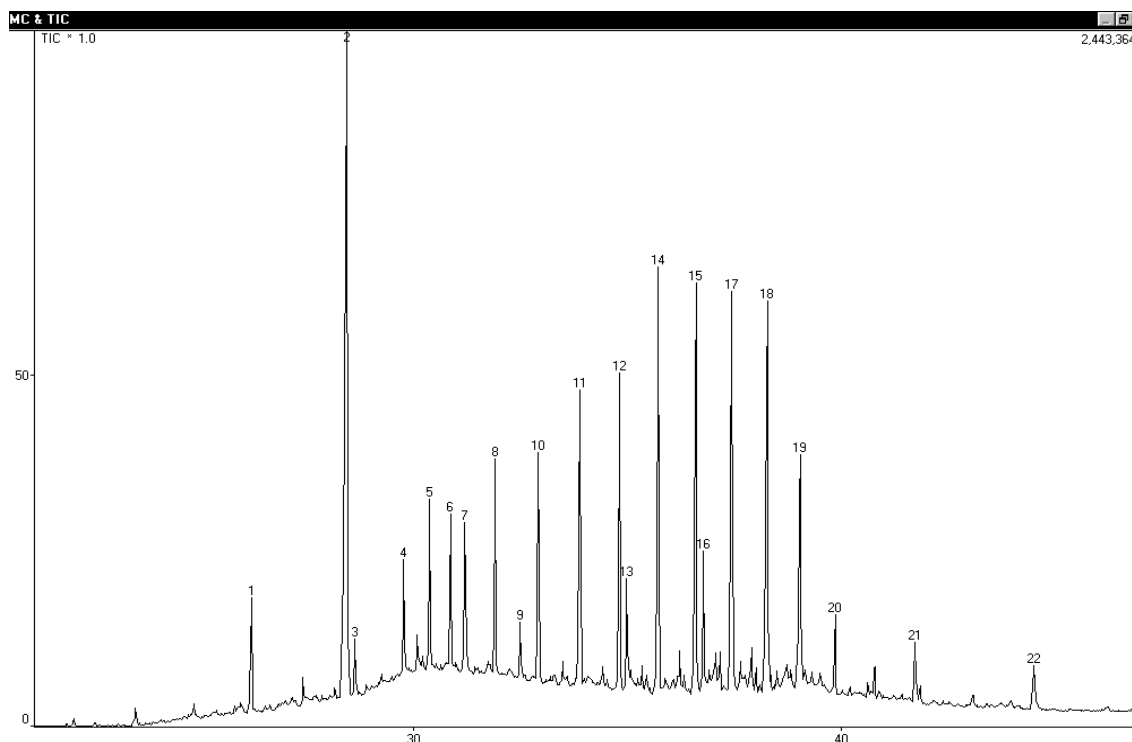
Este isolado foi o que melhor se desenvolveu durante, ou seja, as condições de cultivo favoreceram seu crescimento sendo obtida maior quantidade de biomassa. Através da análise do extrato obtido dessa levedura, podemos levar em consideração a presença de substâncias como o ácido oléico e seu éster o oleato de etila formado pela condensação do ácido oléico com etanol. Foi identificado uma alta concentração de ácido oléico representado pelo pico 2 do espectro, contendo 20,44% do total (Figura 12).

De acordo com resultados encontrados por Ratledge (1996), leveduras que apresentam 20% de lipídios é considerada promissora para fins industriais. Contudo vários ajustes podem interferir na quantidade e tipo de lipídio produzido pela levedura já que ela canaliza os elementos do meio de cultura para produção de diversas substâncias. Amaretti et al., (2011) utilizando meio rico em Glicerol encontrou resultados confirmatórios que a espécie de *R. glutinis* apresenta grande capacidade de armazenar lipídios, corroborando assim com os resultados encontrados nesse estudo.

Neste estudo, as condições de crescimento como pH em torno de 6 e temperatura de 28°C $\pm$ 2°C, proporcionou um melhor rendimento na produção de lipídios de maneira geral, sendo estes resultados apoiados por Saenge et al., (2011); Aksu e Eren (2005; 2007). Esses resultados estão apoiados nos resultados de Maldonade et al., (2008) que afirmam que *Rhodotorula* é uma levedura rica em bioprodutos, entre eles o β -caroteno. Nossos resultados são semelhantes com os de Zhang et al. (2014), onde foi possível obter uma alta concentração de ácido oléico a partir de bioprodutos extraídos de *Rhodotorula*, entretanto em condições diferentes de cultivo.

Aksu e Eren (2007) tiveram resultados semelhantes, entretanto com o meio de cultura enriquecido com fontes de carbono naturais, tais como melaço de beterraba e soro de leite. As diferenças na produção e concentração de células ocorreu devido a composição dos açúcares, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes que apoiaram o desenvolvimento fúngico.

Figura 12: Espectro referente ao ácido oléico obtido de *Rhodotorula* URM 6683.

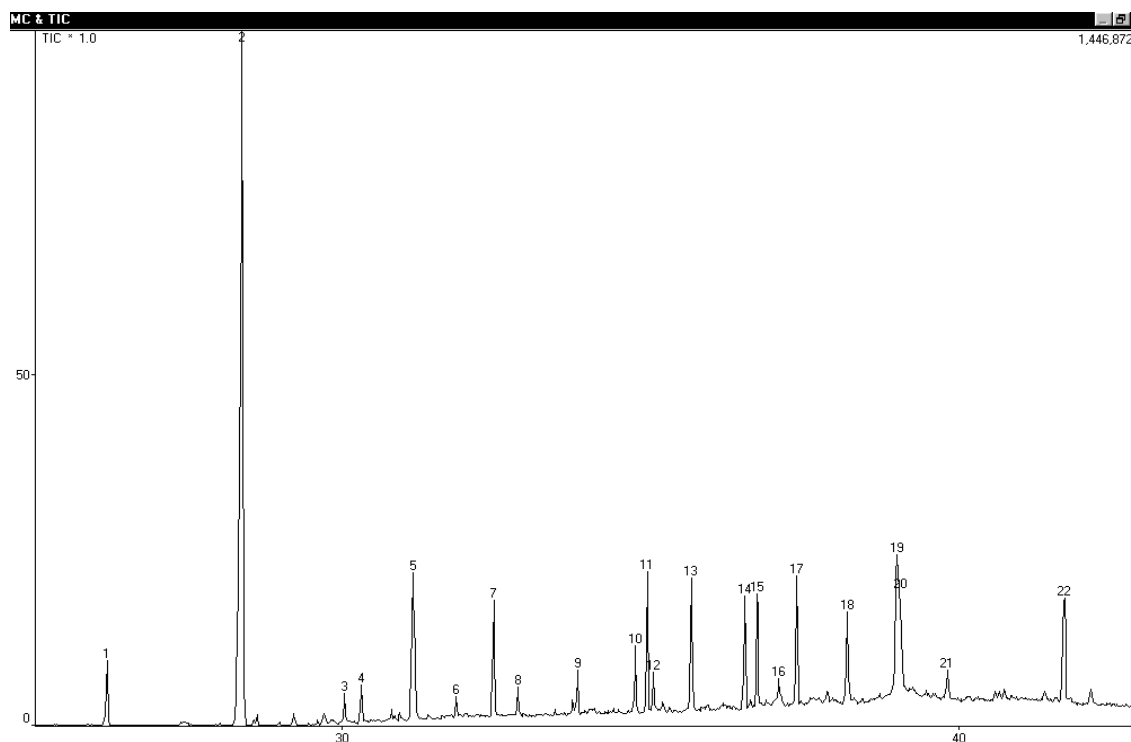


URM 7040

Ao analisarmos os produtos gerados pelo isolado URM 7040, foi verificado em destaque a presença do ácido oléico e do oleato de etila. Representados pelos picos 5 e 2 respectivamente no espectro de massa (Figura 13). O oleato de etila com o tempo de retenção corresponde a 36,38%, já o ácido oléico apresenta 7,14% dos produtos encontrados e limitados por CG-MS, dentre outros produtos podemos citar a presença de alcanos e esteroides, que não foram claramente identificados.

A presença do oleato de etila também pode estar relacionada com a produção de carotenóides que conferem a cor alaranjadas a avermelhadas como descritas por Johnson & Schroeder (1995) em algumas espécies de leveduras incluindo as do gênero *Rhodotorula*. A presença desses ésteres sugere a presença de formas esterificadas de carotenóides. Estudos realizados com outros microrganismos comprovam essa via alternativa para produção de astaxantina, como os resultados encontrados por Sarada et al. (2002), que estudaram a via biossintética de lipídios e ésteres produzidos por *Haematococcus pluvialis*. Como nem toda a biossíntese é conhecida sabe-se que vários outros subprodutos fazem parte dessas reações até chegar ao seu produto final (Sarada et al. 2002).

Figura 13: Espectrometria de massa evidenciando o pico 2 relativo oleato de etila, do isolado de *Rhodotorula* URM 7040.



Os nossos resultados são similares aos de Akzu e Eren (2005) quando referem que pH 7.0, temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ e taxa de aeração de 2,4 vvm são condições de crescimento para uma boa obtenção de bioprodutos por *Rhodotorula*. A capacidade de desse gênero para o cultivo em diferentes fontes de carbono, como glicose, sacarose e lactose é uma notável vantagem, quando comparado com os resultados obtido com outras leveduras pigmentadas na literatura. Dessa forma, o isolado URM 7040 é uma levedura promissora para a obtenção de bioprodutos devido ao crescimento em fontes de carbono de baixo custo.

5.3 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E EXPERIMENTAL *IN VIVO*

As cepas clínicas de *C. albicans*, quanto aos padrões de susceptibilidade com os antifúngicos comerciais anfotericina B, nistatina, fluconazol e o ácido óleico, através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), apresentam sensibilidade a anfotericina B e fluconazol com CIM 0,5–1,0 $\mu\text{g/ml}$ e CIM 0,125–1,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente como ilustrado na Figura 14. No que se refere ao perfil de susceptibilidade, tanto o antifúngico azólico quanto poliênico tiveram atividade contra

cepas de *C. albicans*. Os valores de CIM para nistatina e o ácido oléico foram respectivamente CIM 2–8µg/ml e CIM 256–1024µg/ml. Estes valores não puderam definir sensibilidade ou resistência uma vez que ainda não há padrão no documento do CLSI.

A cepa controle utilizada nos testes foi *C. tropicalis* ATCC 750, que teve para anfotericina B CIM 0,5µg/ml e para fluconazol 1,0µg/ml. Estas concentrações estão descritas no documento, o que corrobora como os nossos resultados. No entanto as CIM 2µg/ml de nistatina e CIM 256µg/ml de ácido oléico não podem ser comparadas por não constar padrão no CLSI (Tabela 5).

Nossos resultados, contudo, estão de acordo com os estudos de Gamarra et al. (2014), onde isolados de *C. albicans* foram sensíveis quando testadas frente ao fluconazol e nistatina. Quando comparamos os testes desenvolvidos por Choukri et al. (2014) com nistatina verificamos que o CIM foi ainda menor que aquelas encontradas no nosso trabalho. Contudo para avaliar a atividade antifúngica de nistatina, se fez necessário adaptar a metodologia proposta pelo CLSI, com base em anfotericina B por se tratar de outro poliênico. Todos os isolados de *C. albicans* estudados por Liu et al. (2014) foram também sensíveis a nistatina, entretanto cerca de 1% dos isolados apresentaram resistência a fluconazol. Nossos resultados, também, estão apoiados nos de Lattif (2011) onde mais de 90% dos isolados foram sensíveis ao fluconazol onde as CIM variaram de 0,5 a 8µg/mL. Esses dados confirmam a sensibilidade de *C. albicans* aos antifúngicos padrão utilizados no tratamento de candidíase vaginal.

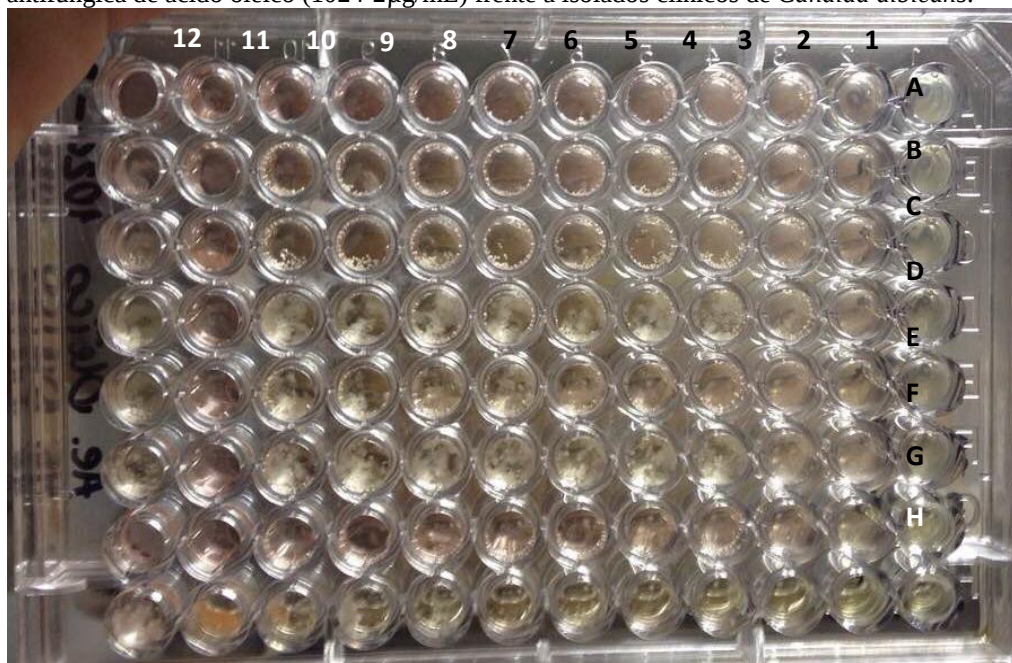
Novas propostas de antifúngicos vêm sendo exploradas e um novo recurso e promissor são os com menores efeitos colaterais e melhor eficácia terapêutica. Diversos trabalhos têm apresentado ação antimicrobiana de óleos essenciais. Contudo pouco se explora da utilização de lipídios com ação antifúngica. Menezes et al. (2009) verificaram sensibilidade do extrato das folhas de *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum*, que foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* com um MIC de 250mg/mL, 125mg/mL e de 62,5mg/mL, respectivamente. Os nossos resultados expressaram uma CIM de 256µg/ml e 1024µg/mL de ácido oléico frente os isolados de *C. albicans*. Os resultados aqui obtidos não mostraram cepa totalmente resistente, sendo considerada uma opção terapêutica futura. Contudo, novos estudos devem ser realizados quanto à toxicidade e efeitos indesejáveis. Dessa forma, os dados

obtidos neste trabalho se mostram promissores e podem servir na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desse bioproduto.

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados de *Candida albicans* a anfotericina B, fluconazol, nistatina e ácido oléico. *CIM / **CIF.

Isolado	Susceptibilidade antifúngica (CIM)			
	ANF	FLZ	NYS	ÁOL
URM 0743	1.0 µg/mL	1.0 µg/mL	4 µg/mL	1024 µg/mL*
URM 4977	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL**
URM 4986	1.0 µg/mL	0.25 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL*
URM 4987	1.0 µg/mL	0.5 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL**
URM 4990	0.5 µg/mL	0.125 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL*
URM 5900	1.0 µg/mL	0.5 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL*
URM 5974	1.0 µg/mL	0.25 µg/mL	8 µg/mL	1024 µg/mL*
ATCC 750	0.5 µg/mL	1.0 µg/mL	2 µg/mL	256 µg/mL*

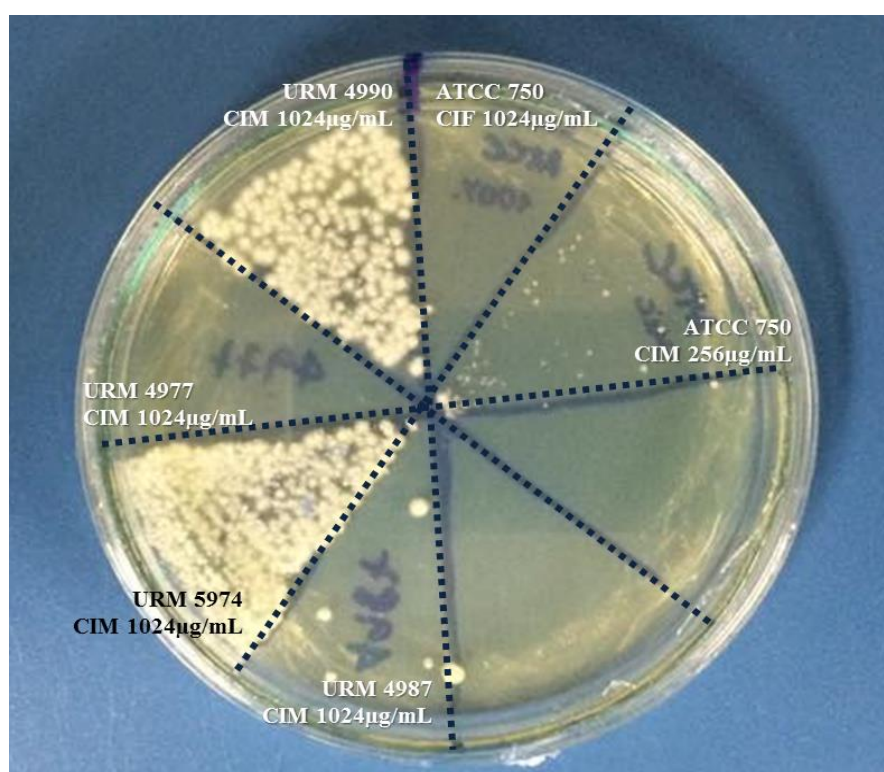
Figura 14: Placa de microtitulação 96 poços utilizada no teste de susceptibilidade antifúngica de ácido oléico (1024-2µg/mL) frente a isolados clínicos de *Candida albicans*.



Fonte: NUNES SILVA, 2015

Os isolados que apresentaram sensibilidade ao ácido oléico foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura composto de ágar Sabouraud com 50mg/L de cloranfenicol e incubadas a 28°C por até quinze dias para confirmação da atividade. Com o retrocultivo foi constatado que a concentração de 1024µg/mL teve ação fungicida nos isolados URM 4977, URM 4987. A ação fungicida para o ATCC 750 esteve presente no poço com concentração de 512µg/mL. Nos demais isolados testados o ácido oléico teve ação fungistática a 1024µg/mL, com exceção do ATCC 750 que apresentou CIM em 256µg/mL (Figura 15).

Figura 15: Retrocultivo (SDA 28°C/72h) dos isolados clínicos de *C. albicans* visivelmente sensíveis ao ácido oléico (1024-2 µg/mL).



Experimental *in vivo* - visto que o enriquecimento ambiental aumenta o bem estar dos animais levando-os a uma redução no estresse, ansiedade e frustração (Sorensen et al. 2004; Wurbel et al. 1998). Segundo Newberry (1995) qualquer modificação do ambiente resulta na melhoria do funcionamento biológico desses animais. Sirois (2008) afirma que, gaiolas que estimulem a atividade com rodas para correr e até tubos simples nos quais os animais possam se esconder são os principais materiais usados para enriquecimento ambiental.

Figura 16: Gaiolas com enriquecimento ambiental: tubos simples de papelão.



A administração dos antibióticos resultou numa pré-disposição dos animais, e depois de inoculado via intravaginal 50µl da suspensão fúngica a candidíase vaginal foi constatada (Figura 17 e 18). Dessa forma, foi desnecessário protocolos de imunossupressão uma vez que foi simulado o mais comum fator predisponente à candidíase vaginal, desconsiderando o que afirma Martines et al. (2001) e Zhao et al. (2002) quando se referem a imunossupressão para modelos experimentais de candidíase vaginal.

Os resultados mostraram que ratas em antibioticoterapia e infectadas com uma concentração de 10^6 células/mL foi ideal para estabelecer candidíase vaginal. Segal e Josef-Lev (1995) e Martines et al. (2001) constataram que para indução de candidíase vaginal por *C. albicans* via intravaginal, é necessária inoculação de suspensão numa concentração de 10^7 células/mL. Contudo, neste trabalho a infecção foi alcançada com uma carga fúngica menor. Os parâmetros avaliados nos animais durante o processo de infecção estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros monitorados após inoculação fúngica.

<i>Infecção</i>	<i>Lesões na pele</i>	<i>Perda de pelo</i>	<i>Piloereção</i>	<i>Alterações na mucosa</i>	<i>Presença de secreção</i>	<i>Morte</i>
1ºdia	+	-	+	-	-	-
2ºdia	+	+	+	-	-	-
3ºdia	+	+	+	+	+	-
4ºdia	+	+	-	+	+	-
5ºdia	+	+	-	+	+	-

Ao exame direto foi confirmada a infecção através do quantitativo de células de leveduras ovais e hialinas identificadas através de lâminas clarificadas com solução

aquosa de KOK 10%, vista ao microscópio óptico (400x). E, em cultura, foram obtidas colônias de leveduras cremosas de coloração branca a bege, como apresentam as figuras abaixo.

Figura 17: A: Células de leveduras ovais e hialinas aderidas às células epiteliais da mucosa vaginal. B: numerosas células de leveduras ovais e hialinas agrupadas em cachos. C: numerosas células de leveduras ovais e hialinas agrupadas com formação de hifas.



Figura 18: Colônias de leveduras obtidas do semeio do fluido vaginal em meio de cultura composto de Sabouraud Dextrose ágar com 50mg/L de cloranfenicol, incubadas a 28°C por até sete dias.



Um animal com candidíase vaginal foi eutanasiado para realização de análises histopatológicas. Além disso, foi realizado exame direto dos fragmentos de tecidos, que confirmaram mais uma vez a infecção (Figura 19) e inoculados em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar onde foi obtido o agente etiológico da doença (Figura 20).

Após confirmação da infecção, os animais foram tratados com ácido oléico por sete dias. Onde no quinto dia de tratamento foi realizada coleta de material biológico da cavidade vaginal para confirmação de cura. Ao exame direto apenas raras células foram visualizadas, contudo não mais havia hifas o que não caracteriza doença, uma vez que

pode ser considerada microbiota do animal (Figura 21). Durante o processo de infecção foi visto algumas alterações na mucosa vaginal externa, a exemplo de um prolapso vaginal. Contudo, após o tratamento foi notado uma significativa recuperação das lesões deixadas na mucosa externa da vagina do animal (Figura 22).

Figura 19: A e B: Exame direto dos fragmentos de tecidos da mucosa vaginal com várias células de leveduras ovais e hialinas aderidas ao tecido. **C:** células de leveduras desenvolvendo filamentos, típicos de *C. albicans*.

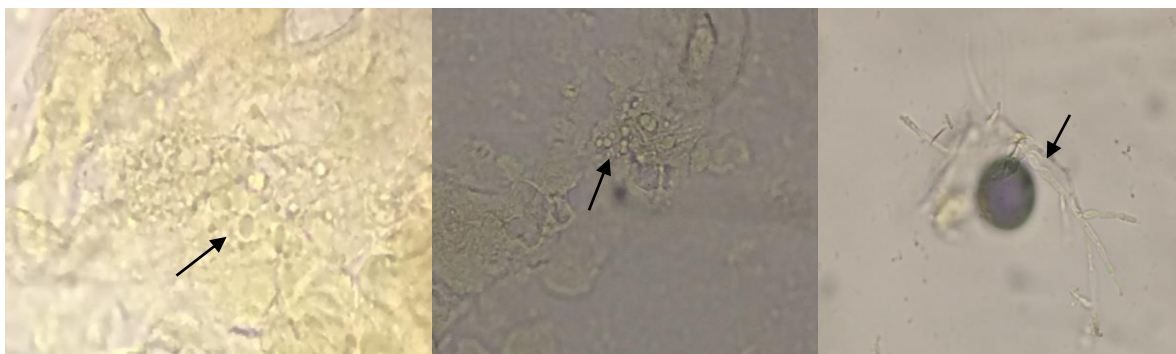


Figura 20: Macroscopia de *Candida* sp. em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos da mucosa vaginal. Colônias com bordas lisas; e coloração creme.



Figura 21: A e B: escamas epiteliais da mucosa vaginal livre de aderências e parasitismo. C: raras células de leveduras ovais e hialinas aderidas à escama epitelial caracterizando microbiota.

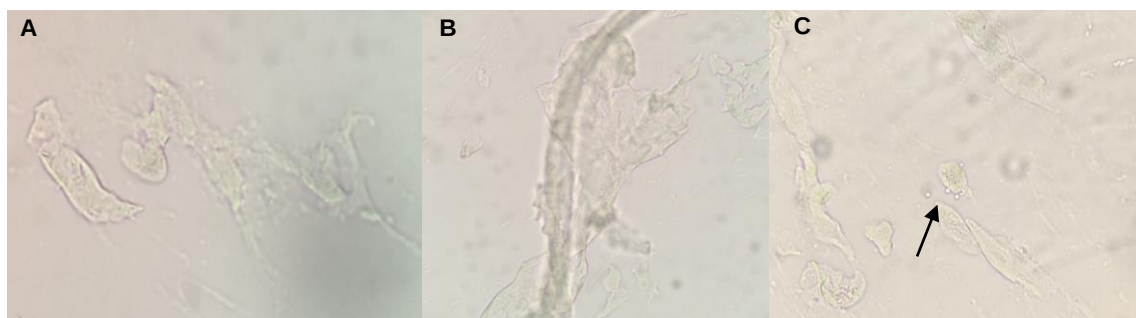
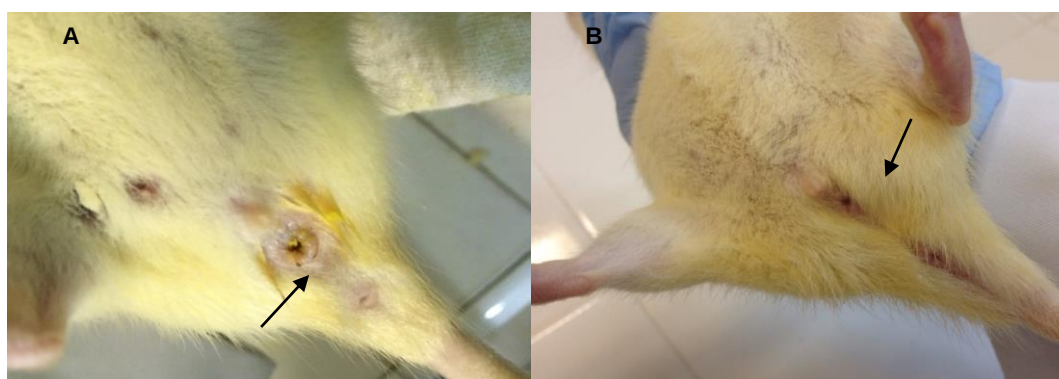


Figura 22: A: Prolapso vaginal em animal com candidíase vaginal. B: Animal tratado com ácido oléico, e mucosa vaginal restabelecida.



Pietrella et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha* sp. e assim como nosso trabalho, bioprodutos tiveram uma boa ação *in vitro* e *in vivo*, onde apresentaram ação fungistática e fungicida. Menezes et al. (2009) relataram que bioprodutos de folhas apresentaram ação antifúngica, *in vitro*, frente a isolados de *C. albicans*. Diferente dos nossos resultado, apresentaram uma CIM muito elevada variando de 62,5–250mg/mL. De tal forma, esses resultados são motivos para novas investigações na busca de novas terapêuticas na promoção à saúde.

6. CONCLUSÕES

- A identificação clássica apresentou resultados, contudo não foi conclusiva para as espécies de *Rhodotorula*.
- Métodos moleculares são necessários na identificação do gênero *Rhodotorula*. Técnicas como sequenciamento da região ITS e também espectrometria de massa, foram adequadas, e em concordância.
- O volume do meio de cultura de 100mL ao final de 120 horas de fermentação foi o mais adequado para obtenção de maior quantidade de biomassa.
- A levedura *Rhodotorula mucilagionsa* URM 6683 utilizada no processo fermentativo é uma boa produtora de metabólitos secundários, destacando o ácido oléico.
- Isolados de *Candida albicans* apresentaram sensibilidade a anfotericina B, fluconazol e nistatina.
- O ácido oléico mostrou atividade antifúngica frente a isolados clínicos de *C. albicans* e *Candida tropicalis* ATCC 750.
- O isolado de *C. albicans* URM 4977 foi selecionado devido ao padrão de sensibilidade para a realização do teste *in vivo*;
- É possível realizar modelo de candidíase vaginal experimental sem imunossupressão sistêmica.
- O ácido oléico foi eficiente no tratamento da candidíase vaginal experimental.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, A.; Khan, A.U. 2009. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 144: 68–71.
- Akiba Y, Sato K, Takahashi K, Matsushita K, Komiyama H, Tsunekawa H, Nagao H. 2001. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *Journal of Applied Poultry Research* 10:154-161.
- Akiba, Y. *et al.* 2000. Availability of cell wall-fractured yeast, *Phaffia rhodozyma*, containing high concentration of astaxanthin for egg yolk pigmentation. *Animal Science Journal*, v. 71, n. 3, p. 255-260.
- Aksu, Z., Eren, A. T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* 40: 2985–2991
- Aksu, Z., Eren, A. T. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal* 35: 107–113.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.V.; Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and sons, New York.
- Almeida Filho GL, Passos MRL, Gouvêa TVD. 1995. Candidíase. In Passos MRL Doenças sexualmente transmissíveis. 4ª ed. Rio de Janeiro: *Cultura Médica*.
- Almeida, G. M. D. 2005. *Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas. Tese de Doutorado. São Paulo.
- Altun, H. U.; Meral, T.; Aribas E. T.; Gorpelioglu, C.; Karabıcak, N. 2014. A Case of Onychomycosis Caused by *Rhodotorula glutinis*. *Case Reports in Dermatological Medicine*. Article ID 563261, 4 pages.
- Amarreti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A.; Rossi, M. 2011. Lipid production from glycerol by *Candida freyschusii* proceedings of FEMS. 14º Congress of European Microbiologists, Geneva, Switzerland, p. 126.
- Amrouni, B.; Pereiro Júnior, M.; Florez, A.; Pontes, C.; Izquierdo, I.; Torıbio, J. 2000. A phase-III comparative study of the efficacies of flutrimazole versus clotrimazole for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *J. Mycol. Med.*, v.10, n.2, p.62-65.
- Andersen, D.; Renshaw, Joanna C.; Wiebe M. G. 2003. Rhodotorulic acid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Mycol. Res.* 107 (8): 949–956.
- Barbosa, L. C. A.; Maltha, C. R. Á. e Cruz, M. P. 2005. Composição química de extrativos lipofílicos e polares de madeira de *Eucalyptus grandis*. *Science & Engineering Journal*. 15 (2): 13 – 20.
- Barnnet, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. 2000. Yeast: characteristics and identification. 3 ed. Cambridge: University press, 1139p.

- Bauters Tiene GM, Dhont MA, Temmerman Marleen IL, Nelis HJ. 2002. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am J Obstet Gynecol* ;187:596-602.
- Bauters, T.G.M.; Dhont, M.A.; Temmerman, M.I.L.; Nelis, H.J. 2002. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.87, n.3, p.569-574.
- Bennett, J E. 1990. Searching for the yeast connection. *N. Engl. J. Med.*; 323:1766-7.
- Beopoulos, A.; Cescut, J.; Haddouche, R.; Uribe Larrea, J. L.; Jouve, C. M.; Nicaud, J. M. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375-387.
- Bhosale, P., Bernstein, P. S. 2004. β -Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* v.31, p. 565–571.
- Bhosale, P.; Gadre, R. V. 2002. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced b-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 349–353.
- Bhuiyan, M.; Tucker, D.; Watson, K. 2014. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of fatty acid profiles of Antarctic and non-Antarctic yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* (2014) 106:381–389.
- Swarajit Kumar Biswas, Koji Yokoyama, Kazuko Nishimura and Makoto Miyaji. 2001. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1191–1199.
- Black, C.A.; Eysers, F.M.; Russell, A.; Dunkley, M.L.; Clancy, R.L.; Beagley, K. 1998. Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection. *Infect. Immun.*, v.66, n.3, p.1273-1275.
- Bombardelli, M.F.; Martins, E. T.; Svidzinski, T. I. E. 2007. Candidíase vulvovaginal na gravidez. *FEMINA*. Outubro. vol 35. nº 10.
- Bonfim, T. M. B. 1999. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo. Curitiba, 159 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Botella-Pavía, P.; Rodríguez-Concepción, M. 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, v.126, p.369-381.
- Brasil. 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. 8. ed. Brasília: Editora MS.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. (FASEB) Journal*, Bethesda, vol.9, nº15, p. 1551-1558.
- Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde-Cimerman N. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett*. 244(2):229-34.

- Buzzini, P.; Martini, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p. 1020-1025.
- Candido, R.C.; Torqueti, T.M.R.; Franceschini, S.A.; Garcia, F.R.; Manini, M.E.C. 1999. In vitro activity of antimycotic agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. *Mycopathologia*, v.44, n.1, p.15-20.
- Canhos, V. P.; Umino, C. Y.; Manfio, G. P. 2004. Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA.
- Cardoso CRB, Souza MA, Ferro EAV, Favoreto Junior S, Pena, JDO. 2004. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regener*; 12(2): 235-43.
- Carrara, M.A.; Bazotte, R.B.; Donatti, L.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L.; Patussi, E.V.; Batista, M.R. 2009. Effect of experimental diabetes on the development and aintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats. *Am J Obstet Gynecol*; 200:659.e1-659.e4.
- Chang, CW and Wang, PH. 2002; Fell, JW and Statzell-Tallman, A. 2000; Fell, JW, Statzell-Tallman, A, Lutz, MJ and Kurtzman, CP. 1992.
- Chociai, M. B.; Machado, I. M. P.; Fontana, J. D.; Chociai, J. G.; Busato, S. B.; Bonfim, T. M. B. 2002. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 38, n. 4, out./dez.
- Choudhari, S. M., Ananthanarayan, L., Singhal, R. S. 2008. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of b-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3166-3173.
- Choukri, F.; Benderdouche, M.; Sednaoui, P. 2014. In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agentes. *Journal de Mycologie Médicale*. 481; 5.
- Cleff, M. Br.; Wendisch, I.; Cabana, A. L.; Rodrigues, M. R.; Braga De Mello, J. R.; Meirelles, M. C. A.; Hernández-Escareño, J. J. 2011. Experimental vaginal candidiasis: Assessment of *Origanum vulgare* for its treatment. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(24), pp. 4207-4211.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. CLSI, Pennsylvania, USA.
- Costa, I.; Martelli da Silva. 1987. Production of b-carotene by *Rhodotorula* strain. *Biotech. Letters*, 9, 373-375.
- Costa, I. 1992. Produção de β -caroteno por uma espécie do gênero *Rhodotorula*. Rio de Janeiro, RJ. Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica) - Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Costa, E. C.; Teixeira, M. F. S.; Dantas, T. V. M.; Melo, V. S. P.; Araujo, S. A. C.; Rolim, B. N. 2009. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122.
- Cunha, R. B.; Castro, M. S.; Fontes, W. 2006. Espectrometria de massas de proteínas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 36, janeiro/junho.
- Cunha, C. A. C. 2001. Identificação e quantificação do teor de ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 em frangos de corte. Dissertação. Florianópolis/SC.
- Cutrona, A. F., M. Shah, M. S. Himes, and M. A. Miladore. 2002. *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. *Am J Orthop*. 31:137-40.
- Czaika, V.; Tietz, H.J.; Schmalreck, A.; Sterry, W.; Schultze, W. 2000. Antifungal susceptibility testing in chronically recurrent vaginal candidosis as basic for effective therapy. *Mycoses*, v.43, n.2, p.45-50.
- Dai, C.; Tao, J.; Xie, F.; Dai, Y.; Zhao, M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 2130-2134.
- Daniel KP, Robinson M. 2005. Update on the treatment of sexually transmitted iseases. Available internet <<http://www.uspharmacist.com/NewLook/DisplayArticle.cfm>>.
- Davies, G. H. 1976. Carotenoid. In: Goodwin, T.W. Chemistry and biochemistry of plats pigments. P. 38-165. Academic Press, New York.
- De Angelis, R.C. 2001. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, p. 269-271.
- De Azeredo, L.A.; Gomes, E.A.; Mendonca-Hagler, L.C.; Hagler, N. A. 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Int Microbiol*. 1(3):205-8.
- De Barros MG; Queiroz LA; Cavalcanti MAQ. 1990. Fungos isolados do ar e do piso de ambientes fechados do Hospital Escola da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. *Bol Micol*. 5(1/2):69-72.
- De Cremer K, Lanckacker E, Cools TL, Bax M, De Brucker K, Cos P, Cammue BP, Thevissen K. 2014. Artemisinins, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov 3. pii: AAC.04229-14.
- De Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueira, M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau Voor Fchimmelcultures.
- De Luca, A., Carvalho, A., Cunha, C., Iannitti, R. G., Pitzurra, L., Giovannini, G., Romani, L. 2013. IL-22 and IDO1 Affect Immunity and Tolerance to Murine and Human Vaginal Candidiasis. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003486.
- De-Bernardis, F.; Boccanera, M.; Adriani, D.; Girolamo, A.; Cassone, A. 2002. Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, v.70, n.5, p.2725-2729.

- De-Bernardis, F.; Cassone, A.; Sturtevant, J.; Calderone, R. 1995. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect. Immun.*, v.63, n.5, p. 1887-1892.
- De-Bernardis, F.; Santoni, G.; Boccanera, M.; Spreghini, E.; Adriani, D.; Morelli, L.; Cassone, A. 2000. Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, v.68, n.6, p.3297-3304.
- Del-Rosso, J.Q.; Zellis, S.; Gupta, A.K. 1998. Itraconazole in the treatment of superficial cutaneous and mucosal *Candida* infections. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, v.98, n.9, p.497-502.
- Diktas H, Gulec B, Baylan O, Oncul O, Turhan V, Acar A, Gorenek L. 2013. Intraabdominal abscess related fungaemia caused by *rhodotorula glutinis* in a non-neutropenic cancer patient. *Acta Clinica Belgica*; 68-1.
- Easterling, E. R.; French, W. T.; Hernandez, R.; Licha, M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 356-361.
- Edelman, D.A.; Grant, S. 1999. One-day therapy for vaginal candidiasis: A review. *J. Reprod. Med.*, v.44, n.6, p.543-547.
- Ekendahl, S.; O'Neill, A. H.; Thomsson, E.; Pedersen, K. 2003. Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *Microb Ecol.* 46(4):416-28.
- Elizondo-Zertuche M.; Robledo-Leal, E.; González, J.G.; Cecenas, L.A.; González, G. M. 2014. Efficacy of ravuconazole in a murine model of vaginitis by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.*
- Fell, J. W.; Statzell-Tallman, A. 1998. *Rhodotorula*. F. C. Harrison. In: Kurtzman C. P.; Fell, J. W.; editors: *The Yeast, a taxonomic study*. New York: Elsevier; p. 800-27.
- Fell, J. W.; Statzell-Tallman, A. 2000. *Rhodotorula*. F. C. Harrison. In: Kurtzman C. P.; Fell, J. W.; editors: *The Yeast, a taxonomic study*. New York: Elsevier; p. 800-27.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1}D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1351±1371.
- Fernandes CE, Machado RB. 1996. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. *Rev Bras Med Ginecol Obstet*; 7: 100-4.
- Ferrazza MHSH, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. 2005. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 27(2): 58-63.
- Feuerschuette, O. H. M.; Silveira, S. K.; Feuerschuette, I.; Corrêa, T.; Grando, L.; Trepani, A. 2010. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. *FEMINA*. vol 38. nº 2.
- Fidel Júnior, P.L.; Cutright, J.; Steele, C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, v.68, n.2, p.651-657.

- Fidel Júnior, P.L.; Luo, W.; Steele, C.; Chabain, J.; Baker, M.; Wormley Júnior, F. 1999. Analysis of vaginal cell populations during experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.*, v.67, n.6, p.3135-3140.
- Fidel Júnior, P.L.; Maria, E.L.; Dale, H.C.; Larry, T.; Jack, D.S. 1995. Mice immunized by primary vaginal *Candida albicans* infection develop acquired vaginal mucosa immunity. *Infect. Immun.*, v.63, n.2, p.547-553.
- Fidel, P. L. Jr. 2002. Distinct protective host defense against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol.* 40 (4):359-75.
- Foldvari MJ, Radhi J, Yang G, He Z, Rennie R, Wearley L. 2000. Acute vaginal candidosis model in the immunocompromized rat to evaluate delivery systems for antimycotics. *Mycoses*, 43: 393-401.
- Frengova, G. I., Beshkova, D. M. 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*, v. 36 p.163–180.
- Freydiere, A. M.; Guinet, R.; Boiron, P. 2001. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology*. 39(1): 9-33.
- Fuenteria, A.M. 2004. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosasinensis*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado.
- Gadanh, M.; Sampaio, J. P. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. Glutinis* sensu stricto and *Rh. Dairensis* comb. Nov. *FEMS Yeast Res.* 2 (1): 47-58
- Gamarra, S.; Morano, S.; Dudiuk, C.; Mancilla, E.; Nardin, M.E.; Méndez, E. A.; Garcia-Effron, G. 2014. Epidemiology and Antifungal Susceptibilities of Yeasts Causing Vulvovaginitis in a Teaching Hospital. *Mycopathologia*. 178:251–258.
- Garcia F, Svidzinski TIE. 2002. Candidíase Vulvovaginal: Aspectos clínicos, terapêuticos e principais fatores de risco em população assistida pelo sistema público de saúde em Paranaíba – PR. *Ver Bras Farmacol*; 83:11-4.
- Ghelardi, E.; Tavanti, A.; Lupetti, A.; Celandroni, F.; Boldrini, E.; Campa, M.; Senesi, S. 1998. Control of *Candida albicans* murine vaginitis by topical administration of polycarbophil-econazole complex. *Antimicrob. Agent. Chemoth.*, v.42, n. 9, p.2434-2436.
- Giraldo, P.C.; Feitoza, S.B.N.; Gonçalves, A.K.S.; Cornetta, M.C.M.; Eleutério-Junior, E.; Tristão, A.R. 2006. A resposta imune celular da mucosa vaginal às vulvovaginites. *J bras Doenças Sex Transm* 18(4): 263-265.
- Giugliano, D., Esposito, K. 2008. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Current Opinion in Lipidology*, v. 19, n. 1, p. 63-68.
- Góes-Neto, A., Loguercio-Leite, C., Guerrero, R. T. 2005. DNA Extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: perform of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18(2): p.19-32.
- Goldani, L. Z., D. E. Craven, and A. M. Sugar. 1995. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. *J Med Vet Mycol.* 33:267-70.

- Goodwin, T.W. 1952. The comparative biochemistry of carotenoids. Chapman & Hall LTD., 1^a edition, London.
- Goodwin, T.W. 1965. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press.
- Granger, L.M. 1993. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by simple method. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, p. 1151-1156.
- Grigoriou O, Baka S, Makrakis E, Hassiakos D, Kapparos G, Kouskouni E. 2006. Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*;126:121-5.
- Halbe, H.W.; Hegg, R.; Fernandes, C.E.; Gonçalves, N.; Rossi, M.C.A.; Cury, T.Q. 2000. Estudo da eficácia e tolerabilidade do fenticonazol no tratamento da vulvovaginite por *Candida albicans*. *Rev. Bras. Méd.*, v.57, n.11, p.1306-1311.
- Hamamoto, M.; Sugiyama, J.; Goto, S.; Komagata, K. 1986¹. Numerical taxonomy based on the electrophoretic mobility of enzymes in the genera *Rhodospiridium*, *Cystofilobasidium* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*; 32: 89-99.
- Hamamoto, M.; Sugiyama, J.; Komagata, K. 1986². DNA base composition of strains in the genera *Rhodospiridium*, *Cystofilobasidium* and *Rhodotorula* determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Gen. Appl. Microbiol.*; 32: 215-23.
- Hamamoto, M.; Sugiyama, J.; Komagata, K. 1987. DNA – DNA reassociation studies of strains in the the genera *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*; 33: 57-73.
- Hawksworth D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422–1432.
- Hernandez-Almanza, A.; Montanez, J. C.; Aguilar-Gonzalez, M. A.; Martinez-Avila, C.; Rodriguez-Herrera, R.; Aguilar, C. N. 2014. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience* 5: 64–72.
- Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRR, Holanda JCP, Milan EP. 2007. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 29 (1):3-9.
- Irazusta V.; Nieto-Penalver, C. G.; Cabral, M. E.; Amoroso, M.J. Figueroa, L. I. C. 2013. Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 Process *Biochemistry* 48: 803–809.
- Jones, PJ. 2002. Clinical Nutrition: 7. Functional foods — More Than Just Nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, v. 166,n.12, p.1555-1563.
- Johnson, E.A.; Schroeder, W.A. 1995. Microbial carotenoids production. *Advances Biochemistry Engineering* , v.53, p.119-178.
- Jonhson, E.A.; Gil-Hwan, An. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Review in Biotechnology*. v.11, p.297-326.
- Kaiser, P.; Surmann,P.; Valletin, G.; Fuhrmann, H. 2007. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *Journal of Microbiological Methods* 70: 142–149.

- Kaliyaperumal M., Kalaichelvan, P. T. 2008. *Ganoderma australe* from southern India, *Microbiological Research*, Volume 163, Issue 3, Pages 286-292.
- Kim, S. G.; Chu, K. H.; Kim, E. Y. 2011. Determination of optimum fermentation conditions for carotenoid production by *Rhodotorula aurantiaca* K-505. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v.28, n.1, p.216-220.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F. ; David, J.C.; Stalpers, J.A. 2008. Ainsworth & Bisby's. Dictionary of Fungi. tenth edition. Wallingford. CABI Publishing.
- Konaté A.; Yavo W.; Kassi F. K.; Djohan V.; Angora E. K.; Barro-Kiki P.C.; Bosson-Vanga H.; SoroF.; Menan E.I.H. 2013. Aetiologies and contributing factors of vulvovaginal candidiasis in Abidjan (Cote d'Ivoire). *Journal De Mycologie Médicale*. 448. 7.
- Kovachev, S. M.; Vatcheva-Dobrevska, R. S. 2014. Local Probiotic Therapy for Vaginal *Candida albicans* Infections. *Probiotics & Antimicro. Prot.* DOI 10.1007/s12602-014-9176-0.
- Krisky, N.I. 2001. Carotenoid antioxidants. *Nutr.*, v. 17,p. 815-817.
- Kurtzman, C. P. e Fell, J. W. 2000. The Yeasts. A Taxonomic Study. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, The Netherlands.)
- Kurtzman, C. e Fell, J.W. 1998. The Yeasts - A Taxonomic Study. Elsevier: São Paulo. Edição 4. 1076 pags.
- Kurtzman, C.P., e J. W. Fell. 2006. Yeast systematics and phylogeny: Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In C. A. Rosa and G. Peter, eds., *The Yeast Handbook*. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. 2011. The Yeasts, a taxonomic study. 5 ed Amsterdam. Elsevier Science Publishers, v. 2, 1069p.
- Kwon-Chung K. J.; Benett, J. E. 1992. Infections due to *Trichosporon* and miscellaneous fungi. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger;. P. 768-82.
- Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. 2002. Tratado de Micologia Médica, 9 ed., São Paulo, Sarvier..
- Landell, M. G. A.; Silva, M. A. 2004. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. *Visão Agrícola*, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 18-23.
- Lattif, Ali Abdul. 2011. Molecular typing and in vitro fluconazole susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic and nondiabetic women with vulvovaginal candidiasis in India. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 44, 166e171.
- Levinson, W.; Jawetz, E. 1998. Microbiologia médica e imunologia. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Li, M.; Liu, G. L.; Chi, Z.; Chi, Z. M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, v.34, n.1, p.101-107.
- Li, J.; Shan Y.; Fan S.; Liu, X. 2014. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal Candidiasis. *Mycopathologia*.178 (3-4): 279-83.

- Liang J, Tian Y. , Yang F., Zhang JP, Skibsted L.H. 2009. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chemistry*, vol. 115 (4), p. 1437-1442.
- Libikind, D.; Brock, M.V. 2006. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.22, p. 687-692
- Libikind D, Brizzio S, van Broock M. 2004. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. *Folia Microbiol (Praha)*; 49(1):19-25.
- Lim, G. B.; Lee, S.Y.; Lee, E. K.; Haam, S. J.; Kim W. S. 2002. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal* 11: 181–187.
- Lima, U. A.; Sato, S. 2001. Produção de lipídios por microrganismos. *Biotechnology Industrial*. 2. Ed. São Paulo: Blucher, 2001. Cap. 16, pag. 447-463.
- Lima-Neto, R.; Santos, C.; Lima, N.; Sampaio, P.; Pais, C.; Neves, R. P. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 2, 515-522.
- Liu, X.P.; Fan, S.R.; Peng, Y.T.; Zhang, H.P. 2014. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *Journal de Mycologie Médicale* 24: 106-111.
- Llovera Suarez, V.; Perurena Lancha, M. R. 2004. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. *Ver Cubana Med Trop*. 56 (1):21-5.
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 2008. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 46:374-376.
- Loguercio-Leite, C. 2004. Taxonomia de fungos. Espósito E Azzevedo, J.L. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. EUCS: Caxias do Sul, p.47-90.
- Macedo, Danielle P. C.; Oliveira, Neiva T.; Farias, Aline M. A.; Silva, Vanessa K. A.; Wilhelm, Ana B.; Couto, Fabíola M. e Neves, Rejane P. 2010. Esophagitis caused by *Candida guilliermondii* in diabetes mellitus: first reported case. *Medical Mycology*, Vol. 48, No. 6, 862-865.
- Maeder, M.; Vogt, P.R.; Shaer, G.; von Graevenitz, A.; Gunthard, H.F. 2003. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Infection*. 31(3):181-3.
- Magliani, W.; Conti, S.; Cassone, A.; De-Bernardis, F.; Polonelli, L. 2002. New immunotherapeutic strategies to control vaginal candidiasis. *Trend. Molecul. Med.*, v.8, n.3, p.121-126.
- Magliani, W.; Conti, S.; Salati, A.; Arseni, S.; Frazzi, R.; Ravanetti, L.; Polonelli, L. 2002. New strategies for treatment of *Candida* vaginal infections. *Rev. Iberoam. Micol.*, v.19, n.3, p.144-148.
- Maldonado, I.R.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Scamparini, A.R.P. 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, *Food Chemistry* 107: 145–150.

- Maldonado, I.R.; Scamparini, A.R.P.; Rodriguez-Amaya, D. B.; 2007. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:65-70.
- Malisorn, C.; Suntornsuk, W. 2008. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology* 99: 2281–2287.
- Malisorn, C.; Suntornsuk, W. 2009. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal* 43: 27–32.
- Manfio, G.P. 2000. Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil, Relatório Final. Campinas.
- Mardh, P.A.; Rodrigues, A. G.; Genc, M.; Novikova, N.; Martinez-de-Oliveira, J. Guaschino, S. 2002. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis – a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int. J STD AIDS*. 13 (8): 522-39.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47:2912-2917.
- Marova, I.; Carnecka, M.; Halienova, A.; Certik, M.; Dvorakova, T.; Haronikova, A. 2012. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management* 95: S338 e S342.
- Martines, A.; Ferrer, S.; Santos, I.; Jimenez, E.; Sparrowe, J.; Regadera, J.; Gomez, D. L.H.F.; Gargallo, V.D. 2001. Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob. Agent. Chemoth.*, v.45, n.12, p.3304-3309.
- Martinez A, Ferrer S, Santos I, Jimenez E, Sparrowe J, Regadera J, Gomez De Las Heras F, Gargallo-Viola D. 2001. Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats. *Antim. Agents. Chem.*, 41: 3304–3309.
- Matsuoka, M.; Mendes, L. C.; Loureiro, M. F. 2003. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). *Rev. Bras. Ci. Solo*, 7:425-433.
- Menday, A.P. 2002. Symptomatic vaginal candidiasis after pivmecillinam and norfloxacin treatment of acute uncomplicated lower urinary tract infection. *Inter. J. Antimicrob. Agent.*, v.20, n.4, p.297-300.
- Menezes, E. A.; Mendes, L. G.; Cunha, F. A. 2009. Antifungal resistance of *Candida tropicalis* isolated in the State of Ceará. *Rev. Bras. Med. Trop.* 42(3):354-355.
- Menezes EA, Cunha MCSO, Cunha FA. 2011. Identificação Preliminar de Algumas Espécies do Gênero *Candida* spp. em Meio Cromógeno: Resultados de Dois Anos de um Estudo Multicêntrico Realizado no Ceará. *Rev Patol Trop* 40: 297-303.
- Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. 2009. In vitro evaluation of the anti-fungii activity of essential oils and plant extracts present in the

- amazon region about the strain of *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*. 2009; 38(3): 184-91.
- Menon, S. Gupta, H. R.; Sequeira, R. Chavan, S.; Gholape, D.; Amandeep, Bhilave S.; Chowdhary, A. S. 2014. *Rhodotorula glutinis* meningitis: a case report and review of literature. *Mycoses*, 57, 448–452.
- Mikamo, H.; Kawazoe, K.; Sato, Y.; Hayasaki, Y.; Tamaya, T. 1998. Comparative study on the effectiveness of antifungal agents in different regimens against vaginal candidiasis. *Chemotherapy*, v.44, n.5, p.364-368.
- Mok WY, Luizao RC, do Socorro Barreto da Silva M, Teixeira MF, Muniz EG. 1984. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Appl Environ Microbiol*. 47(2):390-4.
- Moraes, E.M.; Rosa, C.A.; Sene, F.M. 2005. Preliminary notes on yeasts associated with necrotic cactus stems from different localities in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v.65, n.2, p. 299-304.
- Moraes, P.S.A. 1996. Eficácia da imunoterapia na candidíase vaginal de repetição: estudo prospectivo. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.*, v.19, n.1, p.23-28.
- Moraes, P.S.A.; Goiaba, S.L.; Taketomi, 2000. E.A. *Candida albicans* allergen immunotherapy in recurrent vaginal candidiasis. *J. Investig. Allerg. Clin. Immun.*, v.10, n.5, p.305-309.
- Mosci P, Pietrella D, Ricci G, Pandey N, Monari C, Pericolini E, Gabrielli E, Perito S, Bistoni F, Vecchiarelli 2013. A. Mouse strain-dependent differences in estrogen sensitivity during vaginal candidiasis. *Mycopathologia*. Feb;175(1-2):1-11.
- Mulero, M.R.D.; Blank, K.J.; Sieck, T.G. 1998. Genetic basis for protection against experimental vaginal candidiasis by peripheral immunization. *J. Infect. Dis.*, v.178, n.1, p. 227-234.
- Murray, P. R. et al. 2000. *Microbiologia médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Nardin ME, Morano S, Ahumada C. et al. 2000. Prevalência de la candidiasis vulvovaginal y su relación com algunos factores de riesco. *Rev Arg Micol*; 13-9.
- Newberry, R. C. 1995. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, v.44, n.4, p. 229-243.
- Nohmi, T.; Shigeru, A.; Kazuyoshi, D.; Shigeru, T.; Hideyo, Y. Suppression of anti-1995. *Candida* activity of murine neutrophils by progesterone *in vitro*: a possible mechanism in pregnant women`s vulnerability to vaginal candidíasis. *Microbiol. Immun.*, v.39, n.6, p.405-409.
- Nurbhai M, Grimshaw J, Watson M, Bond CM, Mollison JA, Ludbrook A. 2001. Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). *Coch. Dat. Syst. Ver.*, (4):CD002845.
- Ogouyèmi-Hounto, A.; Adisso, S.; Djamal, J.; Sanni, R.; Amangbegnon, R.; Biokou-Bankole, B.; Kinde Gazard, D.; Massougbdji, A. 2014. Place des candidoses vulvo-vaginales au cours des infections génitales basses et facteurs de risque associés chez les femmes au Bénin. *Journal de Mycologie Médicale*. 24, 100-105.

- Olson, J.A. 1999. Carotenoids and human health. *ALAN*, v. 49 (3 Suppl 1), p. 7-11.
- Otto-Bier. 1970. Bacteriologia e Imunologia, 11ª edição. Editora Melhoramentos.
- Paiva, L.C.F.; Vidigal, P.G.; Donatti, L.; Svidzinski, T. I. E.; Consolaro, M.E.L. 2012. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron* 43:497–502.
- Pappas, P. G. 2006. Invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 20, n. 3, p. 485-506.
- Park, P.K.; Kim, E.Y.; Chu, K.H. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology* 53: 148–152.
- Passos, M.R.L.; Machado, D.R.; Goulart Filho; Rubem, A.; Bravo, R.S.; Barreto, N.A. 2002. Um clássico e potente microbicida, a ação do hipoclorito de sódio em infecções vaginais. *DST J. Bras.*, v.14, n.1, p.5.
- Passos, R.; Moriel, D.G.; Lagreze, F.; Gouveia, L.; Maraschin M. e Beirão, L. H. 2007. Fontes naturais de carotenóides de interesse para a Aquicultura: análise comparativa da eficiência de Métodos de extração. *Rev. Bras. Enga. Pesca* 2 [1] 103-113.
- Pasternak, Jacyr. 2012. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein*. 10 (1) : 118-9.
- Pavlova K, Grigorova D, Hristozova T, Angelov A. 2001. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiol (Praha)*. 46(5):397-401.
- Pavlovic M., Mewes A., Maggipinto M., Schmidt W., Messelhäuser U., Balsliemke J., Hörmansdorfer S., Busch U., Huber I. 2014. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 06:123–128.
- Pedroso, L. A. 2009. Estudos dos aspectos clínicos da *Gardnerella vaginalis* e candidíase vaginal. 45 f. Monografia (Curso de Pós-Graduação Especialização em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC, Criciúma.
- Peres, T. B. 2002. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229.
- Perlroth, J; Choi, B.; Spellberg, B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.*, v. 45, n. 4, p. 321-46.
- Petersen, E.E.; Weissenbacher, E.R.; Hengst, P.; Spitzbart, H.; Weise, W.; Wolff, F.; Dreher, E.; Ernst, U.; Della, C.V.; Pohlig, G.; Graf, F.; Kaiser, R.R. 2002. Local treatment of vaginal infections of varying etiology with dequalinium chloride or povidone iodine: A randomised, double-blind, active-controlled, multicentric clinical study. *Arzn. Fors.*, v.52, n.9, p.706-715.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133-163.
- Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., ... Vecchiarelli, A. 2011. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 18.

- Pinna, A., F. Carta, S. Zanetti, S. Sanna, and L. A. Sechi. 2001. Endogenous *Rhodotorula minuta* and *Candida albicans* endophthalmitis in an injecting drug user. *Br J Ophthalmol.* 85:759.)
- Prado, M.; Da Silva, M. B.; Laurenti, R; Travassos, L. R.; Taborda, C. P. 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-21.
- Putignani, L.; Del Chierico, F.; Onori, M.; et al. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Molecular BioSystems Online publication*, DOI: 10.1039/C0MB00138D.
- Pulvirenti, Fabrizio; Pasqua, Paolo; Falzone, Elio; Maffeo, Federico; Gugliara, Carmelo; Guarneri, Luigi. 2010. Sepsis da *Rhodotorula glutinis*: descrizione di un caso clinico. *Le Infezioni in Medicina*, n. 2, 124-126.
- Rad, M. M.; Zafarghandi, S.; Abbasabadi, B.; Tavallaee, M. 2011. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 155: 199–203.
- Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Naglik JR, Challacombe SJ. 2012. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonisation. *Methods Mol Biol.* 2012;845:527-35.
- Ratledge, C. 1996. Microorganisms for lipids. In: Meesters, P.A.; Huijberts, G.N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as carbon source. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.45, n.5, p.575-579.
- Ratledge C. 1988. Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. In *Single Cell Oil*. Ed. R.S. Moreton. Pp. 33-65. John Wiley and Sons. N. Y. USA.
- Razavi, S. H.; Blanchard, F.; Marc, I. 2006. UV-HPLC / APCI-MS Method for Separation and Identification of the Carotenoids Produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* Vol. 25, No.2.
- Ribeiro, E.P.; Seraballi, E.A. G. 2004. *Química de Alimentos*. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher Ltda, 1ª edição, São Paulo, p. 155-157.
- Ringdahl, E.N. 2000. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. Fam. Phys.*, v.1, p.9.
- Rodriguez-Amaya, D. B. 1993. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). *Shelf-life Studies of Foods and Beverages: Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers,. p. 547-589.
- Rosa, C.A.; Morais, P.B; Santos, S.R., Peres Neto, P.R.; LC Mendonça-Hagler; Hagler, A.N. 1995. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycological Research*, v.99,n.9, p. 1047-1054.
- Rosentul, D.C.; Delsing C.E.; Jaeger, M.; Plantinga, T.S.; Oosting, M.; Costantini, I.; Venselaar, H.; Joosten, L.A.B.; van der Meer, J.W.M.; Dupont, B.; Kullberg, B.J.; Sobel, J.D.; Netea, M.G. 2014. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Frontiers in Microbiology. Infectious Diseases*. Volume 5. Article 483.

- Rossi, D. C., Muñoz, J. E., Carvalho, D. D., Belmonte, R., Faintuch, B., Borelli, P., Miranda, A., Taborda, C.P., Daffre, S. 2012. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiology*, 12, 28. doi:10.1186/1471-2180-12-28
- Rossi, M.; Amaretti, A.; Raimond, S.; Leonard, A. 2011. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Dr. Margarita Stoytcheva. ISBN: 978-953-307-713-0.
- Ruivo, C.C.C.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A; Bacci, J.R.M.; Pagnocca, F.C. 2006. *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida picinguabensis* sp. nov. and *Candida saopaulonensis* sp. nov., three ascomycetous yeasts from *Heliconia velloziana* (Heliconiaceae). *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n.5, p. 1147-1151.
- Saenge, C.; Cheirsilp, B.; Suksaroge, T. T.; Bourtoom, T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* 46:210–218.
- Sampaio, J. P.; Gadanho, M.; Santos, S.; Duarte, F. L.; Pais, C.; Fonseca, A. Fell, J. W. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2): 687-97.
- Santos, E.A.; Oliveira, R.B.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. 1996. Yeasts associated with flowers and fruits from semi arid Region of Northeastern Brazil. *Annual Review of Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 33-40.
- Sarada, R.; Usha, T.; Ravishankar, G. A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, v.37, p. 623–627.
- Sassine, A. 2002. Determinação de pesticidas piretróides em leite bovino por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de armadilha iônica-GC/ITMS íon-trap. Dissertação Mestrado IPEN/USP.
- Satyanarayana, T.; Kunze, G. 2010. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, p. 746, Gatersleben, Germany.
- Schneider, T.; Graeff-Hönninger, S.; French, W.T; Hernandez, R.; Merkt, N.; Claupein, W.; Hetrick, M.; Pham, P. 2013. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy* 61: 34 e 43.
- Scupilliti, E.; Bastanzio, C.; De-Lorenzi, G. 1999. Controlled clinical trial on the effects of an original antimycotic drug in the out-patient treatment of candidiasis. *Gaz. Med. Ital. Arc. Sci. Med.*, v.158, n.5, p.141-149.
- Sedmak, J.J.; Weerasinghe, D.K.; Jolly, S.O. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.4, p 107-112.
- Segal, E.; Josef-Lev, A. 1995. Induction of *Candidal* vaginitis in diabetic mice and attempts to prevent the infection. *J. Med. Veter. Mycol.*, v.33, n.1, p.1-8.

- Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. 2014. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol.* Aug;52(6):636-40.
- Sharma,C.; Wankhede, S.; Muralidhar, S.; Prakash, A.; Singh, P.K.; Kathuria, S.; Kumar, D.A.; Khan, N.; Randhawa, H.S.; Meis, J.F.; Chowdhary, A. 2013. *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary carehospital of New Delhi, India. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76: 46–50.
- Sheary, B.; Dayan L. 2005. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Aust Fam Physician.* 34 (3): 147-50.
- Shimp, L.A. 2002. Vaginal and vulvovaginal desordes. In: DERARD, D.C. et al. Handbook of no prescription drugs: an interactive approach to self care. 13. ed. Whashington: American Pharmaceutical Association.
- Shinde, RS, Mantur, BG, Patil, G, Parande, MV, Parande, AM. 2008. Meningitis due to *Rhodotorula glutinis* in an HIV infected patient *Indian Journal of Medical Microbiology.* Volume: 26. (4): 375-377.
- Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. 2004. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Silva, M. C. 2004. Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Campinas, Unicamp.
- Silva, R. C.; Gioielli, L. A. 2006. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 2.
- Singh, P.; Tsuji M.; Singh, S. M.; Roy U.; Hoshino, T. 2013. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology*, V.66, Issue 2. Pg 167-175.
- Sirois, M. 2008. Medicina de Animais de laboratório: Principios e Procedimentos. São Paulo: Roca, 2008. 332p.
- Sobel, J. D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Seminar.* Vol 369 June 9; 369: 1961–71.
- Sobel, J. D. 2010. Genital candidiasis. *Medicine* 38:6 286.
- Sobel, J.D. 1990. Vaginal infections in adult women. *Med. Clin. North. Am.*, v.74, p.1573-1602.
- Sobel, J.D.; Faro, S.; Force, R.W.; Foxman, B.; Ledger, W.J.; Nyirjesy, P.R.; Reed, B.D.; Summers P.R. 1998. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *AmJ Obstet Gynecol* volume 178 number 2.
- Sorensen, D. B.; Ottesen, J. L.; Hansen, A. K. 2004. Consequences of enhancing environmental complexity for laboratory rodents: a review with emphasis on the rat. *Animal Welfare*, v.13, n. 2, p. 193-204.
- Sorensen, K.N.; Wanstrom, A.A.; Allen, S.D.; Takemoto, J.Y. 1998. Efficacy of syringomycin E in a murine model of vaginal candidiasis. *J. Antibiot. Tokyo.*, v.51, n.8, p.743-749.

- Spinillo A, Carratta L, Pizzoli G et al. 1992. Recurrent Vaginal Candidiasis. Results of a Cohort Study of Sexual Transmission and Intestinal Reservoir. *J Repro Med*, 37:343-347.
- Stewart, JS; Lignell, A; Petterson, A; Elfving, E; Soni, MG. 2008. Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass acute and subchronic toxicity studies in rats. *Food Chemistry and toxicology*, v.46, p.3030-3036.
- Stringaro, A.; Pasqualina, C.; Guido, P.; Guiseppe, A.; Cassone, A; De-Bernardis, F. 1997. Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia*, v.13, n.2, p.95-105.
- Taylor, B.N.; Fichtenbaum, C.; Saavedra, M.; Slavinsky, J.-III; Swoboda, R.; Wozniak, K.; Arribas, A.; Powderly, W.; Fidel Júnior, P.L. 2000. *In vivo* virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, v.182, n.3, p.955-959.
- Tinoi, J.; Rakariyatham, N.; Deming, R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* 40: 2551–2557.
- Tozzo, A. B.; Grazziotin, N. A. 2012. Vulvovaginal Candidiasis. *Perspectiva*, Erechim. v.36, n.133, p.53-62.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeias, J.A.N. 1999. Microbiologia. São Paulo: Atheneu., 586p.
- Três, M. V.; Francheschi, E.; Borges, G. R.; Dariva, C.; Corazza, F.C.; Oliveira, J. V.; M Corazza, M.L. 2007. Influência da temperatura na solubilidade de β - caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n. 4, p. 737-743.
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva C. M., Rosa, C. A. 2002. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Syst Appl Microbiol.* 25(2):294-300.
- Unites States Departament of agriculture. 2013. Dairy: world markets and trade. p.27. Disponível em: http://www.fas.usda.gov/dairy_arc.asp. Acesso em: 20/08/2013;
- Ungureanu, C.; Marchal, L.; Chirvase, A. A.; Foucault, A.; 2013. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology* 132: 406–409.
- Usluogullari, B.; Gumus, I.; Gunduz, E.; Kaygusuz, I.; Simavli, S.; Acar, M.; Oznur, M.; Gunduz, M.; Kafali, H. 2014. The role of human Dectin-1 Y238X gene polymorphism in recurrent vulvovaginal candidiasis infections. *Mol Biol Rep* 41:6763–6768.
- Val, I.C.C. e Almeida-Filho, G.L. 2001. Abordagem atual da candidíase vulvovaginal. *J Bras Doenças Sex Transm*; 13: 3-5.
- Valduga, E.; Tatsch, P. O.; Tiggemann, L.; Treichel, H.; Toniazzo, G.; Zeni, J. E.; Di Luccio, M. 2009. Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Rev. Quím. Nov.*, v. 32, n. 9, 2429-2436.

- Yamazaki, M.; Komagata, K. 1981. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospiridium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 (3):361-81.
- Yuan, J.P.; Chen, F. 1999. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v.47, p. 31-35.
- Yang, J.; Tan, H.; Yang, R.; Sun, X.; Zhai, H.; Li, K. 2011. Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Fermentation of Cassava Residues Substrate. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal. Manuscript No.1847*. Vol. 13, No.2.
- Yano, J., Palmer, G. E., Eberle, K. E., Peters, B. M., Vogl, T., McKenzie, A. N., & Fidel, P. L. 2014. Vaginal Epithelial Cell-Derived S100 Alarmins Induced by *Candida albicans* via Pattern Recognition Receptor Interactions Are Sufficient but Not Necessary for the Acute Neutrophil Response during Experimental Vaginal Candidiasis. *Infection and Immunity*, 82(2), 783–792.
- Yen, H. W.; Liu, Y. X. 2014. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.002>.
- Yen, Hong-Wei and Chang, Jung-Tzu. 2014. Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. *J. Biosci. Bioeng.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.001>
- Zhang, J.E.; Luo, D.; Chen, R.Y.; Yang, Y.P.; Zhou Y.; Fan, Y.M. 2013. Feasibility of Histological Scoring and Colony Count for Evaluating Infective Severity in Mouse Vaginal Candidiasis. *Exp. Anim.* 62(3), 205–210.
- Zhang, L.; She, X.; Merenstein, D.; Wang, C.; Hamilton, P.; Blackmon, A.; Hu, H.; Calderone, R.; Li, D. 2014. Fluconazole Resistance Patterns in *Candida* Species that Colonize Women with HIV Infection. *Current Therapeutic Research* 76 84-89.
- Zhang, Z.; Zhang, X.; Tan, T. 2014. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.039>.
- Zhao, J.; Shen, Y.; Chen, W.; Liu, W. 2002. A murine model of *Candida albicans* vaginitis. *Zhong. Pif. Zaz.*, v.35, n.5, p.346-348.
- Zhao, X.; Hu, C.; Wu, S.; Shen, H.; Zhao, Z. 2010. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, v.38, n.5, p. 627-632.
- Zhekisheva, M.; Boussiba, S.; Khozin-Goldberg, I.; Zarka, A.; Cohen, Z. 2002. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol.* 38, 325–331.
- Zhekisheva, M.; Zarka, A.; Khozin-Goldberg, I.; Cohen, Z.; Boussiba, S. 2005. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). *J. Phycol.* 41, 819–826.

- Zheng Y.-G., Hu Z.-C., Wang Z., Shen Y.-C. 2006. Large-Scale Production of Astaxanthin by *Xanthophyllomyces Dendrorhous*, *Food and Bioproducts Processing*, Volume 84, Issue 2, Pages 164-166, ISSN 0960-3085.
- Zhong-Ce Hu, Yu-Guo Zheng, Zhao Wang, Yin-Chu Shen. 2006. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 39, Issue 4, 2, Pages 586-590.
- Zhu, Y.; Shan, Y.; Fan, S.; Li, J.; Liu, X.; 2014. *Candida parapsilosis* Sensu Stricto and the Closely Related Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Vulvovaginal Candidiasis. *Mycopathologia*. DOI 10.1007/s11046-014-9821-x.

ANEXO 01

Ofício nº35/2014 do CEUA/UFPE emitindo parecer favorável à realização do protocolo experimental.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 24 de julho de 2014.

Ofício nº 35/2014

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Rejane Pereira Neves**
Departamento de Micologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.060898/2013-10

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação de carotenóides de leveduras pigmentadas quanto ao potencial antifúngico in vitro e em modelo experimental de candidíase vaginal.**"

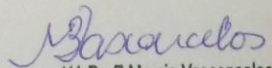
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia;. Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: fêmea; Nº total de animais: 30

Atenciosamente,


 Profa. Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver