ESTUDO DO EFEITO DO FARNESOL SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR DE *Yarrowia lipolytica*

PATRÍCIA MARTINS BOTELHO NUNES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Maria Helena Miguez Rocha Leão, D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2011

ESTUDO DO EFEITO DO FARNESOL SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR DE *Yarrowia lipolytica*

Patrícia Martins Botelho Nunes

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Prof[a]. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc

_____

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc

Banca Examinadora

_____

Prof[a]. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

_____

Prof[a]. Priscilla Vanessa Finotelli, D. Sc.

_____

Prof[a]. Lúcia Moreira Campos Paiva, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. – Brasil

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

NUNES, PATRÍCIA MARTINS BOTELHO

Estudo do efeito do farnesol sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica* – [Rio de Janeiro] 2011.

xv, 82 p. 29,7 cm .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2011.

1. Estresse; 2. *Yarrowia lipolytica*; 3. Dimorfismo;
4. Morfologia; 5. Farnesol .

I. EQ/UFRJ.

II. Título (série)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais,
Rogério e Elizeth, pelo apoio sempre
constante, pelo amor incondicional e
pelo empenho para que eu crescesse
pessoal e profissionalmente.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrada minha gratidão:

A meus pais, Rogério e Elizeth, por todo apoio e sacrifícios que fizeram por mim, durante toda minha vida, e pela educação que é o melhor presente que recebi deles até hoje.

Ao meu irmão Rafael pelo apoio de informática e pela paciência e à Bia por sua amizade.

À minha co-orientadora, Dra. Priscilla Amaral, por me ensinar nestes anos uma nova carreira, por me incentivar e por manter a confiança em mim até quando eu mesmo duvidava.

À minha orientadora, a Dra. Maria Helena Miguez Rocha-Leão, pela confiança e por me dar a oportunidade de aprender mais do que eu esperava.

A Juan Pablo pelo amor e pela paciência, durante todo o período de escrita da tese, pela ajuda com o tratamento de imagens, pelos finais de semana passados comigo no laboratório para a realização dos experimentos e, principalmente, pelo carinho nos momentos mais difíceis.

Ao pessoal do Laboratório 103 por me receberem de braços abertos e por me fazerem sentir parte da equipe, pela companhia, pela paciência e pelo incansável interesse na procura de hifas.

Em especial à Mariana, por me ajudar com o projeto no período da escrita. À Luana e á Kelly por me auxiliarem com as ferramentas utilizadas neste trabalho e ao Diego, por se dispor a ajudar com as imagens.

Aos meus familiares, por entenderem a minha ausência em certos períodos e principalmente, a minha tia Elisa e ao meu tio Robson, que me receberam em sua casa, como uma filha e me permitiram compartilhar de suas vidas de forma tão próxima, hoje vocês são como pais para mim.

À minha prima Bianca por me ceder seu quarto durante a semana, para que eu pudesse estar aqui no Rio em tempo integral.

À família Botero, por me receber tão bem e me incentivar a alcançar meus objetivos.

À Profª Silvia Carriço da Universidade de Aveiro, Portugal, pela idéia do estudo da relação entre farnesol e dimorfismo em *Yarrowia lipolytica*.

Ao pessoal do laboratório de coleóptera do Museu Nacional, pela ajuda com as fotos e à Profª Marcela Monné, por permitir a utilização da lupa do seu laboratório para a obtenção das fotos de morfologia colonial.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a manutenção dos equipamentos e a compra dos reagentes.

Enfim, agradeço a Deus, por ter me dado força de vontade para superar todos os obstáculos e chegar até o fim dessa etapa da minha vida, para que uma nova possa começar.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

ESTUDO DO EFEITO DO FARNESOL SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR DE *Yarrowia lipolytica*

Patrícia Martins Botelho Nunes

Março/2011

Orientadores: Prof[a]. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão (DSc.)
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral (DSc.)

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, dimórfico, do reino Fungi e apresenta uma vasta aplicação tecnológica. Esta levedura é um bom modelo para o estudo do dimorfismo, pois apresenta suas fases morfológicas (hifa, pseudohifa e levedura) bem definidas e não é patogênica. Estudos sobre o dimorfismo têm ganho destaque, pois ele é determinante na virulência da maioria dos fungos patogênicos e o conhecimento dos mecanismos que o regulam pode auxiliar na terapia de doenças causadas por fungos dimórficos, através do desenvolvimento de novos fármacos. Farnesol é um sesquiterpeno, componente de muitos perfumes, é uma molécula sinalizadora ("*quorum-sensing*", molécula QSM), que inibe a formação de hifas em *Candida albicans* e tem apresentado também a capacidade prevenir a formação de biofilme por este fungo. No presente trabalho, a indução da formação de hifas foi realizada com N-acetilglicosamina e soro fetal bovino. A formação de hifas foi analisada através do processamento digital de imagens (em *software* Matlab 7.0.4) obtidas através de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico com aumento

de 400x. Através de um planejamento experimental verificou-se que a agitação utilizada para o cultivo das células de *Y. lipolytica* influenciou de forma significativa a formação de hifas. Agitações inferiores induziram a formação de um maior número de hifas, provavelmente devido a uma menor oferta de oxigênio no meio de cultivo. Farnesol foi adicionado aos meios de cultivo nas concentrações de 300, 600, 900 e 1200 μM para a determinação da concentração mais eficaz para a inibição da formação de hifas. Foi observado que o farnesol inibe o crescimento celular em *Y. lipolytica*. A formação de hifas também foi inibida em 31,6% e esta inibição foi dependente da concentração. Na presença de N-acetilglicosamina como indutor, a inibição da formação de hifas por farnesol chegou a 44,4%.

Abstract of a Dissertation presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

STUDY OF THE EFFECT OF FARNESOL TO CELULLAR MORPHOLOGY OF *Yarrowia lipolytica*

Patrícia Martins Botelho Nunes

March/2011

Supervisors: Prof[a]. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão (DSc.)
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral (DSc.)

Programe: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Yarrowia lipolytica is a strict aerobic, eucariotic, dimorphic, yeast of the kingdom Fungi, and have a vast technological application. This yeast is a good model to dimorphic study, because has definite morphological phases (ovals cells, pseudo-or true hyphaes) and is non-pathogenic. Knowledge of the mechanisms that regulate cellular dimorphism may assist in the therapy of diseases caused by dimorphic fungi, through the development of new drugs to be used or even in preventing these diseases. The response to the various factors of this yeast is the morphological change. Farnesol is a sesquiterpene which is found in many perfumes. It is the signalizing molecule (quorum-sensing), inhibits hyphae formation and Candida albicans biofilm formation. The induction of hypha formation was performed with N-acetylglucosamine and bovine calf serum. Hypha formation was analized with the support of Matlab software 7.0.4. images taken by a digital camera connected to an optical microscope with 400x magnification.

Through an experimental design showed that agitation used for growing cells of *Y. lipolytica* significantly influenced the formation of hyphae. The lower agitation speed induced the formation of a larger number of hyphae, probably due to a reduced oxygen supply in the medium. Farnesol was added to medium at concentrations of 300, 600, 900 and 1200 μM to determine the most effective concentration to inhibit the formation of hyphae It was observed that farnesol inhibited cell growth and hyphae formation of *Y.lipolytica*. The farnesol also inhibited the formation of hyphae in 31,6% and this inhibition was dependent of concentration. In the presence of N-acetylglucosamine as a promoter, inhibition of hyphal formation by farnesol reached 44,4%.

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO.....1

2 - OBJETIVOS.....4

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....5

3.1. Farnesol.....5

3.2.*"Quorum sensing"*.....9

3.3. *Yarrowia lipolytica*.....11

3.3.1. Dimorfismo.....13

4 - METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS.....18

4.1. Materiais.....18

4.2. Equipamentos.....18

4.3. Microrganismo.....19

4.4. Preservação.....19

4.5. Inóculo.....19

4.6. Experimentos para indução da formação de hifas em meio líquido.....20

4.6.1. Descrição dos experimentos.....20

4.6.2. Meios de cultivo.....20

4.6.3. Planejamento experimental.....21

4.7. Experimentos para indução de formação de hifas em meio sólido.....22

4.8. Experimentos para inibição da formação de hifas.....23

4.9. Esterilização.....24

4.10.Métodos Analíticos.....25

4.10.1. Quantificação do crescimento celular.....25

4.10.2. Determinação da concentração de glicose.....26

4.10.3. Processamento digital de imagens.....26

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....29

5.1. Avaliação do cultivo de *Yarrowia lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono.....29

5.2. Avaliação do efeito do soro fetal bovino no cultivo de *Yarrowia lipolytica*.....31

5.3. Planejamento experimental:delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2..... 34

5.4. Indução da formação de hifas em sistemas sob baixa rotação.....38

5.4.1. O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica*.....38

5.4.2. O efeito do soro fetal bovino sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica*.....40

5.5. Avaliação do efeito de *trans-trans* farnesol no cultivo de *Yarrowia lipolytica*....42

5.5.1. Efeito de farnesol sobre a morfologia e o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na presença de soro fetal bovino.....43

5.5.2. Efeito de farnesol sobre a morfologia e o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica.*na presença de N-acetilglicosamina.....48

5.6. Avaliação da morfologia colonial de *Yarrowia lipolytica*.....50

5.6.1. Efeito da fonte de carbono e de soro fetal bovino sobre a morfologia das colônias de *Yarrowia lipolytica* 50

5.6.2. Efeito de farnesol sobre a morfologia das colônias de *Yarrowia lipolytica*.....53

6 – CONCLUSÕES.....56

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....58

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição do meio de cultivo dos experimentos para indução da formação de hifas em meio líquido.....21

Tabela 4.2. Fatores e níveis utilizados no planejamente experimental 2^k, com k = 2....22

Tabela 4.3. Experimentos gerados pelo software *Statistics* 7.0. Código das variáveis independentes do planejamento experimental 2^k, com k = 2.....22

Tabela 4.4. Composição do meio de cultivo dos experimentos em meio sólido.....23

Tabela 4.5. Concentrações de farnesol adicionadas aos meios de cultivo.....24

Tabela 5.1. Taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono.....30

Tabela 5.2. Taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de soro fetal bovino em meios com e sem glicose.....33

Tabela 5.3 Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2, com os valores codificados e reais e os resultados experimentais.....35

Tabela 5.4. Concentração final de células obtida após 24h de crescimento em diferentes concentrações de farnesol.....45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Dimorfismo em *Candida albicans.* (A) Blastosporos; (B) Tubos germinativos; (C) formação de hifas a partir do crescimento apical de tubos germinativos; (D) Micélios; (E) Blastosporos secundários separados dos filamentos. Adapatado de MOLERO et al., 1998.....3

Figura 3.1. Molécula de Farnesol.....5

Figura 3.2. Modelo simplificado da rota Efg1-dependente de indução da formação de hifas em *Candida albicans.* (DAVIS-HANNA *et al*., 2008).....7

Figura 3.3. Imagens de microscopia óptica de *Y. lipolytica* em aumento de 400x, apresentando células na forma leveduriforme (A) e na forma de hifas (B).....13

Figura 4.1. Imagem obtida a partir de microscópio ótico de uma amostra contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x).....19

Figura 4.2. Semeadura por esgotamento em placa: segundo e terceiro conjunto de estrias.....23

Figura 4.3. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu.....25

Figura 4.4. Sequência da binarização. (A) imagem RGB obtida com microscópio óptico; (B) imagen em preto e branco; (C) imagem binarizada.....27

Figura 4.5. Valores de alongamento para diferentes tamanhos de células de *Yarrowia lipolytica*.....28

Figura 5.1. Cinética de crescimento celular de *Y.lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono.....30

Figura 5.2. Cinética de consumo de glicose extracelular para o cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono.....31

Figura 5.3. Cinética de crescimento celular de *Y.lipolytica* em meio contendo glicose e em meio contendo glicose e 10% de soro fetal bovino e em meio contendo somente glicose.....32

Figura 5.4. Cinética de crescimento celular de *Y.lipolytica* na presença de 10% de soro fetal bovino (SFB) em meios com e sem glicose.....33

Figura 5.5. Cinética de consumo de glicose extracelular para o cultivo de *Y. lipolytica* na presença de 10% de soro fetal bovino.....34

Figura 5.6. Diagrama de Pareto para o delineamento composto central rotacional.....36

Figura 5.7. Foto de microscopia óptica em aumento de 400x de amostra retirada da camada superficial do meio de cultivo sob baixa rotação.....37

Figura 5.8. Perfil de alongamento para as células de *Yarroria lipolytica* na presença de glicose como fonte de carbono, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm 39

Figura 5.9. Perfil de alongamento para as células de *Yarroria lipolytica* na presença de N-acetilglicosamina como fonte de carbono, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.....40

Figura 5.10. Perfil de alongamento para as células de *Yarroria lipolytica* na ausência de glicose e na presença de 10% de soro fetal bovino, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.....41

Figura 5.11. Perfil de alongamento para as células de *Yarroria lipolytica* na presença de glicose e de 10% de soro fetal bovino, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.....42

Figura 5.12. Cinética de crescimento celular de Y. lipolytica em meio YPD* com 10% de soro fetal bovino (experimento controle) e em meio YPD*com 10% de soro fetal bovino e diferentes concentrações de farnesol, com agitação de 60 rpm.....44

Figura 5.13. Percentagem de hifas formadas (considerando hifas as células com alongamento maior que 2) nos cultivos de *Y. lipolytica*, sob agitação de 60 rpm, em meio YPD* com 10% de soro fetal bovino e com diferentes concentrações de farnesol.....46

Figura 5.14. Porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol (I) para *Y. lipolytica* nos cultivos sob agitação de 60 rpm em YPD* com 10% de soro fetal bovino e com diferentes concentrações de farnesol.....47

Figura 5.15. Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina (experimento controle) e em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina e diferentes concentrações de farnesol, com agitação de 60 rpm.....48

Figura 5.16. Porcentagem de hifas formadas nos cultivos de Y. lipolytica sob agitação de 60 rpm em meio YPN com 1% de N-acetilglucosamina e com diferentes concentrações de farnesol.....49

Figura 5.17. Porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol para *Y. lipolytica* nos cultivos sob agitação de 60 rpm em meio YPNcom 1% de N-acetilglicosamina e diferentes concentrações de farnesol.....50

Figura 5.18. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.....51

Figura 5.19. Foto de microscopia óptica (aumento de 400x) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.....51

Figura 5.20. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono.....52

Figura 5.21. Foto de microscopia óptica (aumento de 400x) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono.....52

Figura 5.22. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino.....53

Figura 5.23. Foto de microscopia óptica (aumento de 400x) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino.....53

Figura 5.24. Fotos digitais das colônias de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono, na presença de 600 µM de farnesol.....54

Figura 5.25. Fotos digitais das colônias de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono, na presença de 600 µM de farnesol.....54

Figura 5.26. Fotos digitais das colônias de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino, na presença de 600 µM de farnesol.....54

Figura 5.27. Fotos de microscopia óptica (aumento de 400x) de *Y. lipolytica* em meio sólido na presença de glicose(A), N-acetilglicosamia (B) e glicose e soro fetal bovino (C), na presença de 600 µM de farnesol.....55

1. INTRODUÇÃO

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia, não patogênica, originalmente era chamada *Candida lipolytica* e seu estudo tem atraído grande interesse, pois apresenta uma grande aplicação biotecnológica por sua capacidade de metabolizar lipídeos e hidrocarbonetos e de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Yarrowia lipolytica apresenta também a capacidade de dimorfismo, ou seja, alterar sua morfologia celular de acordo aom as condições do ambiente. A homologia existente entre este fungo saprófita e a espécie patogênica *C. albicans* sugere a utilização de *Y. lipolytica* para o estudo do dimorfismo (RUIZ-HERRERA & SENTRANDEU, 2002).

O fungo dimórfico *Candida albicans* é um dos mais importantes fungos patogênicos oportunistas do homem. Este fungo faz parte da microbiota normal do homem e de animais e está presente de forma comensal na pele, nas cavidades oral, nasal, aural e vaginal e no trato intestinal (PORTELA, 2006). Acredita-se que o principal fator de virulência deste fungo está relacionado com a sua capacidade de mudar a morfologia celular de leveduras para a forma filamentosa. Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre a transição dimórfica, a densidade celular e o sistema *quorum sensing* e para identificar a molécula indutora desta transição. Segundo Hornby *et al*. (2001), existe uma correlação entre a quantidade de "*quorum sensing molecule*" (QSM) produzida e o número de células presentes.

Vários fatores predispõem ao desenvolvimento da candidíase, como por exemplo, distúrbios endócrinos, gravidez, deficiência de ferro, etc. No entanto, o aumento do número de infecções sistêmicas por fungos oportunistas se deve, principalmente, ao maior número de pacientes HIV (*human immunodeficiency virus*), pacientes em quimioterapia e transplantados (HUBE, 2000). Todos estes pacientes apresentam seu sistema imune debilitado, seja pela doença que apresentam ou pelo tratamento a que são submetidos. Outros fatores que estão relacionados são o aumento do número de procedimentos invasivos e o uso abusivo de antibióticos. De qualquer modo, em todos estes pacientes a candidemia (infecção invasiva) está relacionada com o aumento das taxas de mortalidade e um maior tempo de hospitalização (BLANCO, 2009).

O tratamento das infecções fúngicas, principalmente as sistêmicas, é difícil e lento devido à grande familiaridade genética existente entre hospedeiro e patógeno, ambos eucariotas. Os fármacos antifúngicos mais utilizados atuam na membrana celular do fungo

que é muito similar à membrana celular do homem (SILVA, 2004). Um número limitado de drogas antimicóticas é viável para utilização em micoses sistêmicas e, geralmente, o tratamento realizado é longo, pois as drogas são utilizadas em doses mínimas para diminuir a sua toxicidade ao paciente.

Devido a todos esses aspectos, os fatores de virulência dos fungos têm sido extensivamente estudados e caracterizados com o objetivo de desenvolvimento de novos medicamentos ou novas formas de prevenção destas doenças. Geralmente, as infecções são desencadeadas por um distúrbio entre a imunidade do hospedeiro e o microrganismo comensal. Muitos fatores estão associados à virulência de *C. albicans,* entre eles a produção de enzimas hidrolíticas, de adesinas na parede celular, a formação de biofilmes e a sua mudança morfológica. (PORTELA, 2006).

Em relação ao papel do dimorfismo como fator de virulência, as células leveduriformes estão relacionadas com a disseminação do microrganismo no ambiente, com seu contato com o hospedeiro e com a sua disseminação pela corrente sanguinea, enquanto que as hifas e pseudohifas são necessárias para a invasão tecidual (geralmente quando infecta órgãos), pois são mais resistentes a ação de fagócitos, portanto, ambas as formas estão presentes na formação de biofilmes e parecem estar relacionadas à virulência. As cepas de *C. albicans* que não apresentam a capacidade de formar hifas são geralmente avirulentas (BLANCO, 2009).

A transição dimórfica em *C. albicans* está relacionada a diferentes condições ambientais "*in vivo"* (Figura 1.1.). A indução do dimorfismo "*in vitro"* pode ser realizada pela adição de indutores ao meio de cultivo como o soro fetal bovino, N-acetil glucosamina, prolina, pela exposição da levedura a pH neutro/alcalino à temperatura de 37°C e à presença de CO_2 (BLANCO, 2009).

A levedura *Yarrowia lipolytica* também apresenta a habilidade de formar hifas. Em cepas selvagens esta habilidade pode proporcionar uma vantagem seletiva quando submetidas a condições de estresse, facilitando a obtenção de nutrientes (GANCEDO, 2001; KAWASSE *et al*., 2003).

Y. lipolytica é um fungo capaz de crescer em meios de cultura simples e complexos, apresentando dimorfismo naturalmente, formando células leveduriformes, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

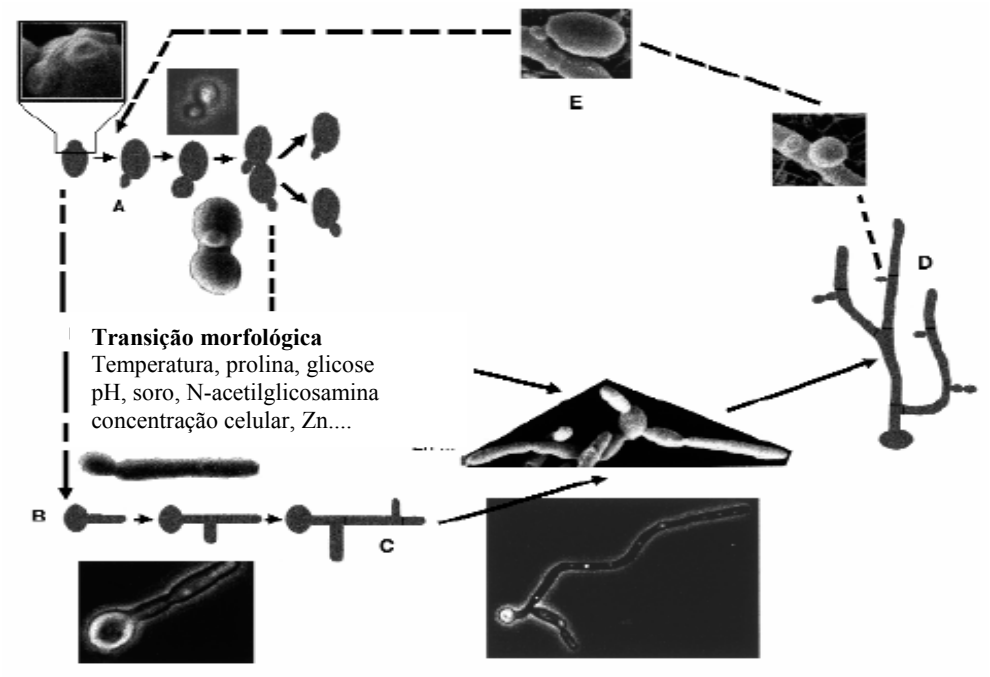

Figura 1.1. Dimorfismo em *Candida albicans.* (A) blastosporos; (B) tubos germinativos; (C) formação de hifas a partir do crescimento apical de tubos germinativos; (D) micélios; (E) blastosporos secundários separados dos filamentos. Adaptado de MOLERO *et al*., 1998.

O dimorfismo de *Y. lipolytica* também está relacionado com a produção de emulsificantes e a degradação de hidrocarbonetos. A investigação desta relação mostrou que a forma leveduriforme é predominante durante a degradação de alcanos e a produção de emulsificante (ZINJARDE *et al.*, 1998).

Y. lipolytica é considerada um modelo adequado para o estudo de dimorfismo em leveduras, pois é susceptível a manipulação, não é patogênica, seu cultivo tem um baixo custo e apresenta fases morfológicas de fácil distinção (JIMÉNEZ-BREMONT *et al.*, 2001).

O farnesol, álcool sesquiterpeno, apresenta atividade *quorum sensing*, é produzido por *Candida albicans* e atua de forma ativa na patogenicidade desta levedura (HORBNY *et al*., 2001; SOUZA SILVA, 2009). Seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que inibe a formação de biofilme em *C. albicans* (RAMAGE *et al*., 2002). Por apresentar também efeito antagônico contra outros microrganismos de interesse humano, entre eles *Aspergillus nidulans* (SEMIGHINI *et al*., 2006) e *Paracoccidioides brasiliensis* (SOUZA SILVA, 2009) e, além disso, apresentar baixa toxicidade para as células normais (NAVARATHNA *et al*., 2007), o estudo da ação do farnesol sobre o dimorfismo em leveduras pode levar à sua utilização como agente coadjuvante no tratamento e na prevenção de infecções fúngicas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal da presente dissertação reside no emprego de farnesol, uma molécula "quorum sensing" na inibição da formação de hifas pela levedura dimórfica Yarrowia lipolytica em meios líquido e sólido visando estudar o seu efeito sobre o dimorfismo.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o cultivo de *Y. lipolytica* em frascos de *erlenmeyer* agitados com meio de cultivo contendo glicose e N-acetilglicosamina como principal fonte de carbono para determinar a característica morfológica e a cinética de crescimento na presença destas fontes de carbono.
- Avaliar o cultivo de *Y. lipolytica* em frascos agitados com meio de cultivo contendo glicose, como principal fonte de carbono, e soro fetal bovino, em diferentes concentrações, como agente indutor da formação de hifas.
- Determinar o efeito da agitação do cultivo sobre a morfologia da levedura *Y. lipolytica*.
- Avaliar o efeito de farnesol sobre a morfologia celular de *Y. lipolytica* através da adição de farnesol em diferentes concentrações.
- Avaliar a morfologia colonial de *Y. lipolytica* em meio sólido na presença e na ausência de farnesol.
- Utilizar o processamento digital de imagens para identificar a formação de hifas durante o cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes condições (na presença de indutores e inibidores de hifas).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Farnesol

Farnesol ($C_{15}H_{26}O$) é um álcool sesquiterpeno constituído por três unidades de isopreno (Figura 3.1), solúvel em água a uma concentração de 1,2 mM (HORBNY *et al*., 2001), líquido, incolor, constituinte de óleos essenciais, como por exemplo o óleo de citronela, grama de limão, tuberose e etc. Comumente é empregado para enfatizar os odores de perfumes florais, mas também é um conhecido pesticida natural para ácaros e um ferormonio para uma diversidade de insetos.

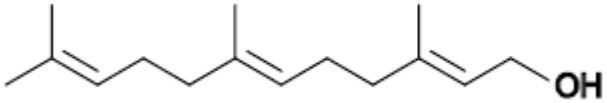

Figura 3.1. Molécula de farnesol.

Sesquiterpenos são substâncias produzidas no metabolismo de plantas terrestres, marinhas, microrganismos e de alguns animais, a partir da rota biossintética do mevalonato. O farnesol é formado pela desfosforilação de trans, trans farnesil difosfato pela enzima farnesil pirofosfatase (FPP), uma enzima chave no metabolismo intermediário da biosíntese de esteróis em eucariotos (HORBNY *et al*., 2003).

Farnesol é uma molécula sinalizadora ("*quorum-sensing molecule*", molécula QSM), que inibe a formação de hifas em *C. albicans* e tem apresentado, também, a capacidade de prevenir a formação de biofilme por este fungo (PORTELA, 2006). As propriedades físicas do farnesol são consistentes com sua função de QSM, pois é uma molécula extracelular e difusível (HORBNY *et al*., 2001).

O fungo dimórfico *C. albicans* é capaz de sintetizar o farnesol, o qual atua como uma molécula QSM e pode ser útil clinicamente para a prevenção de doenças causadas por este fungo através da supressão da filamentação (HORBNY *et al*., 2001). Além do farnesol a *C. albicans* sintetiza mais duas moléculas sinalizadoras: o tirosol (CHEN *et*

al., 2004) e o ácido farnesóico (OH *et al*., 2001). O farnesol não é excretado por *C. albicans* em condições de anaerobiose estrita (MOSEL *et al*., 2005).

Ensaios de bioatividade com 40 análogos do farnesol mostraram que 22 deles inibiram a transição dimórfica em *C. albicans,* apesar do isômero trans (E,E farnesol) apresentar a maior atividade QSM (SHCHEPIN, 2003).

Além da sua função QSM, a molécula de farnesol, em *C. albicans,* também confere proteção ao estresse oxidativo, incluindo peróxido de hidrogênio e geradores de superóxido e, possivelmente desempenha um papel protetor contra fagócitos (WESTWATER *et al.*, 2005).

Farnesol também atua promovendo a apoptose (morte celular programada) em *Aspergillus nigger* e em *Fusarium graminerum,* através da indução da produção de espécies reativos de oxigênio (ERO) (SEMIGHINI *et al*., 2006, 2008).

Ramage *et al.* (2002) estudaram a inibição da formação de biofilme por farnesol em *C. albicans* e constataram que a uma concentração de 300 µM o farnesol pode alterar drasticamente a densidade e a morfologia do biofilme formado por esta levedura. Com a diminuição da concentração de farnesol, o biofilme formado apresentou um maior número de hifas e pseudohifas. Além disso, Ramage e seus colaboradores observaram que após o início da formação de hifas, elas não podem ser inibidas pela adição do farnesol e a subseqüente formação de biofilme não é afetada. Portanto, segundo os autores, a propriedade antibiofilme do farnesol pode ser melhor utilizada em estratégias de prevenção do que em estratégias de tratamento de infecções.

Em 2001, Hornby *et al*. isolaram a QSM farnesol de seis cepas de *C. albicans* e observaram que a máxima produção de farnesol ocorreu a 37°C, quando as celulas se encontravam na sua forma micelial e que a molécula manteve-se estável a temperatura de 100°C, por 30 minutos, e foi resistente à autoclavação. A molécula indutora foi produzida em um amplo intervalo de temperatura de crescimento desta levedura (23 a 43°C). A sua produção foi constante durante todo o crescimento das células e proporcional à massa celular e foi indiferente à fonte de carbono (foram testadas glicose, sacarose, amido, glicerol, galactose e frutose) ou de nitrogênio e ao indutor utilizado. Além disso, sua estabilidade foi mantida por 3 anos a 4°C. Horbny *et al*. (*op. cit.*) também observou que a produção de farnesol ocorre também no corpo humano, durante a candidíase.

A ação de farnesol parece ser mais específica do que simplesmente atuar pela inibição do metabolismo celular. A maioria dos estudos sobre o efeito do farnesol e seus análogos químicos na morfologia celular dos fungos é realizado pela indução da formação de hifas através da rota da adenilciclase (Ras1-Cdc35-PKA-Efg1) (Figura 3.2). Esta rota controla a formação de hifas como resposta a múltiplos estímulos incluindo a utilização de fontes de carbono como N-acetilglicosamina, soro fetal bovino e glicose (DAVIS-HANNA *et al*., 2008).

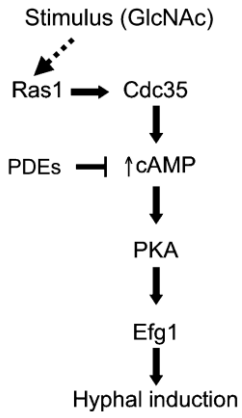

Figura 3.2. Modelo simplificado da rota Efg1-dependente de indução da formação de hifas em *Candida albicans.* (DAVIS-HANNA *et al*., 2008).

A regulação de formação de hifas por esta via parece ser particularmente importante na disseminação de *C. albicans.* Nesta rota, o gene GTPase Ras1, quando ativado, estimula a enzima adenil ciclase (Cdc35) , gerando AMPc, o qual promove a ativação da transcrição de fatores, mediada por PKA, e estes fatores, entre eles o Efg1, vão induzir a transição levedura-hifa (FENG *et al*., 1999). O farnesol parece inibir a formação de hifas afetando a atividade da rota dependente desta sinalização. A maioria dos experimentos relatados na literatura para estudo dos efeitos do farnesol são realizados com adição de N-acetilglicosamina ou glicose, os quais induzem a formação de hifas em *C. albicans* por esta rota específica (DAVIS-HANNA *et al*., 2008).

Outro mecanismo que parece ser importante para a formação de hifas em *C. albicans* é a rota da cascata (proteína mitogênio-ativada) MAP quinase. Segundo Sato *et al*. (2004), o farnesol pode suprimir cada uma das rotas citadas ou ambas (MAPK e EFG1).

Hornby *et al*. (2001) observaram que tanto o farnesol purificado de *C. albicans* quanto o farnesol comercial inibiram a formação de hifas em *C. albicans* a uma concentração de 250 μM e até esta concentração não há inibição do crescimento celular. Sua ação foi efetiva na presença dos três indutores testados: N-acetilglicosamina, prolina e soro fetal bovino.

Mosel *et al*. (2005) relataram que *C. albicans* geralmente responde a uma concentração de 0.9 a 1 μM de farnesol, reduzindo em 50% a formação de hifas em meio como o RPMI 1640 (*Instituto Memorial Roswell Park* - meio de cultura de tecido animal desidratado). Porém, alguns estudos mostram que quando o soro fetal bovino é usado para induzir a formação de hifas em *C. albicans*, é necessária uma maior concentração de farnesol para bloquear a produção de hifas. Mosel *et al*. (2005) utilizaram concentrações entre 150 e 250 μM de farnesol para inibir 50% da formação de hifas em presença de 10% a 20% de soro fetal bovino. Resultados idênticos foram obtidos com soro de porco e de cavalo.

Henriques *et al.* (2006) avaliaram o efeito do farnesol sobre a morfologia celular de *C. albicans* e *C. Dubliniensis* após 12 h de crescimento (fase estacionária) em meio RPMI 1640. A adição da concentração de 150μM de farnesol não causou inibição significativa sobre a taxa de crescimento de ambas as espécies, porém foi eficaz para inibir a formação de hifas e pseudohifas em 96%. Concentrações inferiores a 150 μM de farnesol também inibiram a mudança de morfologia nestas duas leveduras, mas em proporção inferior, o que mostrou que há uma certa dependência entre efeito e concentração de farnesol utilizada. Henriques e colaboradores observaram também que a uma concentração de 300 μM, houve uma inibição total das hifas e pseudohifas, sem afetar o crescimento celular das leveduras. Para os experimentos com soro fetal bovino, foi necessária uma maior concentração de farnesol (400 μM) para obter uma inibição de 100% em *C. albicans*. Esta diferença de concentrações para estudos na presença e na ausência de soro fetal bovino deve-se, segundo Mosel *et al*. (2005), à ação da albumina bovina que reduz a biodisponibilidade deste sesquiterpeno.

O momento da adição de farnesol ao cultivo parece alterar a sua ação sobre as hifas. Mosel *et al*. (2005) relataram que a adição de farnesol em 0, 30, 60 e 90 minutos após a inoculação das células mostrou diferenças no número de hifas inibidas. Até 30 minutos de inoculação, a formação de hifas sofre uma inibição de quase 100%. No

entanto, após 90 minutos, a inibição das hifas foi nula. Uma vez que a formação de hifas tenha sido iniciada, a adição de farnesol será ineficaz para inibi-las.

3.2. "*Quorum sensing*"

Em 1960, com o grande interesse dos pesquisadores pelas bactérias luminescentes *Vibrio fisheri e Vibrio harveyi,* simbiontes marinhos de alguns peixes e moluscos (FUQUA *et al*., 2001), esses começaram os questionamentos sobre a relação da comunicação entre as células destes procariotas e os genes que a regulam (HASTINGS & GREENBERG, 1999). No entanto, somente dez anos depois foi determinada a associação entre a bioluminescência e a densidade celular bacteriana (NEALSON *et al*. 1970). Em 1994, o termo "*Quorum sensing"* foi utilizado pela primeira vez e passou a definir a comunicação entre as bactérias (FUQUA *et al*., 1994).

"Quorum sensing"(QS) é um processo de comunicação entre microrganismos mediado pela densidade celular. O mecanismo principal de regulação é pela produção de autoindutores os quais são liberados no meio extracelular, onde se acumulam. Quando estas substâncias atingem uma determinada concentração, promovem a ativação ou a repressão de vários genes levando as células a exibirem novos fenótipos. Estes fenótipos aperfeiçoam determinadas funções que são mais eficientes quando realizadas por um maior número de células (SOUZA SILVA, 2009).

Nos microrganismos procariontes este fenômeno tem sido vastamente estudado e observou-se que está relacionado com diversos processos celulares, como produção de antibióticos, esporulação, resistência a antibióticos, formação de biofilmes, virulência, etc.(ANDRE, 2007)

Muitas bactérias patogênicas possuem seus fatores de virulência controlados por QS. *Pseudomonas aeruginosa,* muito conhecida por causar infecções graves no homem, apresenta como fator de virulência a capacidade de formar biofilmes em materiais hospitalares e no tecido do hospedeiro e esta habilidade está diretamente relacionada a sua capacidade de organização através do sistema de QS (ANDRE, 2007). Outras bactérias gram negativas e gram positivas (por exemplo *Bacillus, Streptococcus, Staphilococcus*) também já foram estudadas e também apresentaram a influência destas moléculas, as quais já foram identificadas (HASTINGS & GREENBERG, 1999).

O sistema QS tem importante papel na produção de compostos virulentos em inúmeras espécies patogênicas. Estes compostos são imprescindíveis na instalação e na manutenção da infecção no hospedeiro. Fatores importantes que iniciam a colonização do microrganismo através do sistema *"quorum sensing"* são a formação de biofilmes e a capacidade de modificação da morfologia de alguns organismos, seja para colonizar tecidos humanos, plantas ou até mesmo colonizar superfícies como os cascos de navios e outros materiais submersos (BORCHARDT *et al*., 2001).

Em eucariotos, ainda é um fenômeno pouco estudado e tem sido relatado em fungos e, geralmente, está relacionado à transição dimórfica. O primeiro estudo que relata a possibilidade de existência deste fenômeno em fungos foi feito em *Histoplasma capsulatum* por Kugler *et al.* (2000) que relataram a regulação da transição de micélio para levedura nesse fungo patogênico. Muitas espécies virulentas de *H.capsulatum* possuem em sua parede celular α-(1,3)-glucana quando estão na forma leveduriforme enquanto que na forma micelial, não apresentam este constituinte. A produção de α-(1,3)-glucana aparentemente ocorre quando as células estão proliferando dentro de macrófagos do hospedeiro e funciona, portanto, como fator de virulência importante para a sobrevivência deste fungo no ambiente intracelular. Kugler *et al*. (*op. cit*.) sugerem que *H. capsulatum* libera um fator que promove a incorporação de α-(1,3)-glucana à sua parede celular para colonizar as células do hospedeiro.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, álcoois aromáticos são QSM chave para promover a mudança morfológica de células unicelulares leveduriformes para a forma filamentosa. A produção de triptofol e feniletanol ocorre quando esta levedura apresenta alta densidade celular (CHEN & FINK, 2006).

Quorum sensing mediado por farnesol parece ser um fenômeno muito comum em *Candida spp* (HENRIQUES *et al.*, 2006). Em *Candida albicans* já foram identificados e purificados como moléculas com atividade QS, o farnesol (HORNBY *et al*., 2001), o ácido farnesóico (OH *et al*., 2001) e o tirosol (CHEN *et al*., 2004). Todas essas moléculas afetam a morfologia, o crescimento celular e a formação de biofilme nessa levedura. Triptofol e feniletanol reduzem a formação de tubo germinativo em *C. albicans* (CHEN & FINK, 2006).

3.3. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos. Esta levedura, que originalmente era chamada *Candida lipolytica*, é uma espécie das chamadas leveduras "não-convencionais" e seu estudo tem atraído grande interesse, pois apresenta uma grande aplicação biotecnológica por sua capacidade de metabolizar lipídeos e hidrocarbonetos e de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH & GAILLARDIN, 1997). Na maioria das leveduras "não-convencionais", em contraste com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e sendo aeróbio restrito, *Yarrowia lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (ANDREISCHEVAN *et al*., 1997; FLORES *et al*., 2000).

Esta levedura não é considerada patogênica, provavelmente devido a sua incapacidade de sobreviver acima de 35°C (PÉREZ-CAMPOS & DOMINGUEZ, 2001) e, portanto, é utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, aroma de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como *GRAS* (*Generally Regarded As Safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro) (TSUGAWA *et al*., 1969). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al*., 2002).

Y. lipolytica tem como habitat, substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter crescimento ótimo a 30ºC, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Pereira-Meirelles *et al*. (1997) propuseram um mecanismo para a produção de lipase de *Y. lipolytica* em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono, em que a lipase é produzida no início do cultivo, mas se acumula na parede celular, enquanto o substrato é abundante. Com a continuação do cultivo, a disponibilidade de substrato

diminui e a liberação da enzima se torna necessária para assimilação do substrato remanescente. Portanto, obtém-se atividade lipásica máxima durante a fase estacionária do crescimento.

Muitas das cepas produtoras de lipases são capazes de um crescimento dimórfico; porém não há correlação evidente entre esses dois aspectos. Cepas capazes de grande crescimento micelial exibem alta, média e baixa atividade lipolítica. Foi observado que N-acetilglicosamina e citrato promovem intensivo crescimento dimórfico e significante síntese de lipase em *Y. lipolytica*; em contraste, o uso de tampão fosfato ao invés de citrato no meio estimula apenas o crescimento dimórfico (NOVOTNY *et al.*, 1994).

Recentemente, a seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada (DUJON *et al*., 2004), permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas. MULLER *et al*. (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e uma cepa de *S. cerevisiae* na produção de seis enzimas fúngicas e todas as não convencionais foram mais eficientes que a levedura convencional, sendo que *Y. lipolytica* foi o hospedeiro que apresentou melhor performance e reprodutibilidade.

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos (NICAUD *et al.*, 1989), algumas cepas não apresentam atividade invertásica detectável (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997).

A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER & MENDONÇA-HAEGLER, 1981), laticínios, flora de queijos picantes (BARTH & GAILLARDIN, 1997), produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 2001), e é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos.

Um importante papel desempenhado por esta levedura é a degradação de hidrocarbonetos. Segundo Zinjarde *et al*. (1998), muitas espécies de leveduras, bactérias

e fungos filamentosos podem degradar óleo cru, mas algumas cepas de *Y.lipolytica* são as melhores degradadoras, pois conseguem degradar a porção alifática do óleo cru.

Y. lipolytica não produz etanol, mas pode utilizá-lo como fonte de carbono em concentrações até 3%. Altas concentrações de etanol são tóxicas para esta levedura (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. O dimorfismo tem sido estudado como um fator importante para seu crescimento e sua proliferação (SZABO, 1999).

Y. lipolytica pode ser usada como modelo de diferenciação celular pelas suas propriedades dimórficas. É possível obter uma população quase homogênea de leveduras ou de micélios através da manipulação das condições de crescimento. Isto inclui a fonte de carbono, componentes específicos, como o citrato ou soro, e o pH do meio (GUEVARA-OLVERA *et al.*, 1993; RUIZ-HERRERA & SENTANDREU, 2002; SZABO & STOFANÍKOVÁ, 2002).

3.3.1 Dimorfismo

Dimorfismo é a habilidade dos fungos de crescer em duas formas distintas, como levedura (forma oval) e como filamentos (hifas e pseudohifas), e estas formas são reversíveis entre si (Figura 3.3). (SZABO, 1999, KAWASSE *et al.*, 2003)

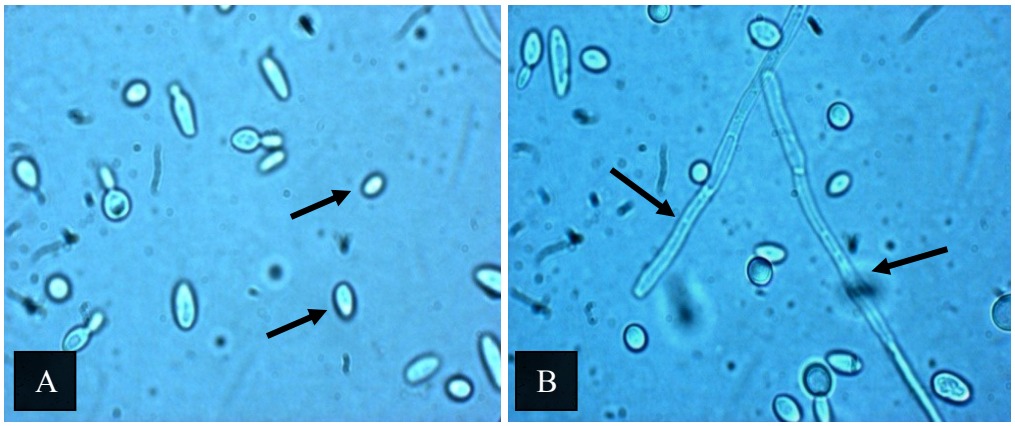

Figura 3.3. Imagens de microscopia óptica de *Y. lipolytica* em aumento de 400x, apresentando células na forma leveduriforme (A) e na forma de hifas (B).

O fenômeno do dimorfismo é particularmente importante, pois em um número expressivo de fungos patogênicos, causadores de doenças em humanos e plantas, o dimorfismo está diretamente relacionado à sua virulência. (SZABO & ŠTOFANÍKOVÁ, 2002).

Entre os fungos patogênicos dimórficos estão *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans.* A caracterização das condições que regulam a morfogênese e diferenciação das células pode levar a importantes descobertas de novos medicamentos ou tratamentos efetivos contra leveduras patogênicas (SZABO & ŠTOFANÍKOVÁ, 2002).

Y. lipolytica é capaz de ser encontrada em três formas morfológicas diferentes: células de levedura, pseudo-hifas e hifas septadas. Micélio verdadeiro consiste de hifas septadas de 3 a 5µm de largura e até vários milímetros de comprimento. Células apicais freqüentemente excedem 100µm, enquanto que os segmentos medem de 50 a 70 µm. Existe apenas um núcleo por segmento. Os septos se assemelham a poros centrais do tipo comum a ascomiceto e diferentes de outras leveduras filamentosas, tendo retículo endoplasmático se estendendo de um segmento ao outro (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

C. albicans e *Y. lipolytica*, apresentam padrões diferentes de germinação, que por sua vez diferem do padrão descrito para *S. cerevisiae*. *C. albicans* germina em um padrão axial; enquanto que *Y. lipolytica* germina em um padrão bipolar independente de ser haplóide ou diplóide. Já *S. cerevisiae*, quando passa para o crescimento de pseudohifas, deixa a germinação bipolar para apresentar germinação unipolar, que resulta nas cadeias lineares filamentosas de células. Entretanto, em um aspecto todas essas leveduras se assemelham: não há casos de sobreposição de locais de germinação (HERRERO *et al.*, 1999).

Polarização celular é essencial para o crescimento filamentoso, já que é requerida para o crescimento da célula sendo restrito a uma pequena área na superfície celular, a ponta da hifa. Isto requer uma alta regulação polarizada da actina do citoesqueleto e do aparato de secreção. Acredita-se que, em eucariontes, a polaridade celular é regulada por membros da família PAK (proteína quinases ativadas por p21) que codificam proteína quinases, como o gene de cópia simples CLA4, localizado no cromossomo V da *Y. lipolytica*. É esperado, portanto, que qualquer mutação que

interfira na manutenção e/ou estabelecimento da polaridade celular aboliria o crescimento filamentoso. Comprova-se isso pelo fato de que a deleção de CLA4 não é letal, mas desloca a síntese de quitina e não permite o crescimento de hifas, tanto em *Y. lipolytica* como em *C. albicans*, sugerindo que CLA4 proteína quinase possui um papel na manutenção da polaridade celular (SZABO, 2001a).

Em *Y. lipolytica*, pesquisas com a deleção do gene MHY1, cuja transcrição aumenta durante a transição para hifa, mostraram que a célula se torna incapaz de ter um crescimento micelial. MHY1 codifica Mhy1p, que é uma proteína do tipo "*zincfinger*" que pode ativar elementos de resposta de DNA ao estresse, sugerindo que este seja um fator de transcrição. A transcrição de MHY1 não é afetada pelo estresse térmico e diminui quando sofre estresse oxidativo ou osmótico ou está sob condições de deficiência de fonte de carbono (HURTADO & RACHUBINSKI, 1999; GANCEDO, 2001). Vários outros genes foram identificados afetando o dimorfismo em *Y. lipolytica*, mas seus mecanismos de funcionamento ainda não foram completamente esclarecidos. SEC14, que é essencial na secreção de proteínas e para a viabilidade de células de *S. cerevisiae*, tem seu homólogo em *Y. lipolytica*, que não é responsável nem pela viabilidade nem pela etapa secretora, mas cuja disfunção resulta na inabilidade da cepa de passar a seu estado filamentoso (SZABO, 2001b). Outra peculiaridade de *Y. lipolytica* é que o gene *Yl*STE7, um homólogo dos genes STE7 de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, não é requerido para o desenvolvimento de hifas; em compensação uma deleção do gene *Yl*TUP1 estimula o crescimento de hifas assim como acontece com a *C. albicans*. Existe uma etapa controlada pelos genes RIM em *Y. lipolytica*, com os genes XPR2/XPR6 responsáveis pela regulação do dimorfismo, que é equivalente em células de *S. cerevisiae*. Há ainda o produto da homeogênese, HOY1, que apresenta regiões homólogas com o ativador transcricional Pho2 de *S. cerevisiae*, que é requerido para a formação de hifas em *Y. lipolytica* (HERRERO *et al.*, 1999; GANCEDO, 2001).

Embora existam vários mecanismos envolvidos na regulação do dimorfismo, a limitação do nitrogênio parece ser um dos sinais mais importantes envolvidos no processo. A formação de pseudo-hifas em *Saccharomyces cerevisiae* tem sido identificada como uma resposta à limitação de nitrogênio (GIMENO *et al.*, 1992). Em contraste com *S. cerevisiae*, Szabo (1999) estudou o dimorfismo de *Y. lipolytica* em meios de cultura líquidos e relatou que a formação de hifas foi inibida pela limitação de

nitrogênio, enquanto que a fonte de carbono, aparentemente não foi importante para a formação de filamentos.

Guevara-Olvera *et al.* (1993) mostraram que a modificação da fonte de carbono pode induzir o dimorfismo em *Y. lipolytica.* Cultivos em glicose forneceram células leveduriformes, enquanto que cultivos utilizando 0,5% de N-acetilglicosamina como fonte de carbono forneceram 55% de hifas após 12h. Além disso, sugerem que submeter a levedura a um choque térmico em água destilada antes do cultivo com N-acetilglicosamina causa um efeito sinérgico para o crescimento micelial, com a formação de até 90% de hifas.

Vários pesquisadores também utilizaram N-acetilglicosamina para induzir a formação de hifas em *Y. lipolytica.* Hurtado *et al*., 2000 obtiveram hifas com a concentração de 1% de N-acetilglicosamina. Zinjarde *et al*., 1998 utilizaram 0,5% de N-acetilglicosamina e sob diferentes condições de aeração e de pH e com esta fonte de carbono obtiveram máxima formação de hifas, quando esta fonte de carbono foi substituída por glicose o número de hifas sofreu uma queda de 20%.

Condições que favorecem a fermentação (ou que inibem a respiração), como a concentração de glicose, a anaerobiose ou a adição de inibidores da cadeia de transferência de elétrons, fosforilação oxidativa, assim como a inibição da síntese de proteínas mitocondriais bloqueiam a formação de hifas em *Mucor* spp. (FRIEDENTHAL *et al*., 1974). O mesmo resultado foi obtido por Szabo (1999), que aplicou Antimicina A, um inibidor da transferência de elétrons da coenzima Q reduzida para o complexo III (citocromo-c redutase), em culturas de *Y. lipolytica*, indicando que o processo de conversão de energia e o metabolismo de carbono podem estar envolvidos na formação de filamentos.

Szabo (1999) mostrou que o pH do meio afeta fortemente a morfologia de células de *Y. lipolytica*, mas apenas na presença de uma fonte de nitrogênio complexa, sugerindo que as células respondem mais a alterações nutritivas do meio com diferentes valores de pH do que ao próprio valor de pH. Em um estudo posterior, Szabo & Štofaníková (2002) comprovaram a importância da presença de fontes de nitrogênio orgânico no efeito do pH na morfologia celular de *Y. lipolytica* em meios líquido e sólido.

Zinjarde *et al.* (1998) testaram o efeito do pH inicial do meio no dimorfismo de *Y. lipolytica*, em pH 4,0, 6,0 e 8,0 e observaram que em pH 8,0 as células foram predominantemente leveduriformes.

Y. lipolytica apresenta um metabolismo estritamente aeróbio. Ruiz-Herrera & Sentrandreu (2002) observaram que quando essa levedura foi exposta a anaerobiose, em meio sólido e líquido, houve a formação de longas hifas. A adição de AMPc inibiu a transição de levedura para micélio, sugerindo um papel da rota de sinalização PKA neste fenômeno, ao contrário do que acontece com *C. albicans.* Nesta levedura as duas rotas (PKA e MAPK) levam à formação de hifas.

Cervantes-Cháves *et al*. (2009) estudaram o papel da rota PKA no dimorfismo de *Y. lipolytica.* Os autores sugerem que as rotas PKA e MAPK atuam de forma contrária no dimorfismo desta levedura. O gene TPk1 em *Y. lipolytica* apresenta funções regulatórias opostas às apresentadas em outros fungos, como por exemplo *C. albicans* e *S. cerevisiae.* Este parece ser o único gene que regula a rota PKA em *Y. lipolytica.*

Kawasse *et al*. (2003) estudaram a aplicação de estresse térmico (degrau de temperatura de 29ºC para 37ºC) e oxidativo (adição de peróxido de hidrogênio até concentrações de 1M) em um cultivo de células de *Y. lipolytica*. Através de processamento digital de imagens foi comprovado que ambas condições de estresse fizeram com que as células de leveduras apresentassem um maior crescimento na forma de hifas.

Henriques *et al.* (2006) observaram que o soro fetal bovino é capaz de induzir a formação de hifas verdadeiras em *C. dubliniensis* a uma concentração de 10%. Kim *et al.* (2000) avaliaram a ação do soro fetal bovino na indução de hifas em *Y. lipolitica.* Os autores realizaram experimentos com 10% de soro fetal bovino e observaram hifas entre 3 e 4h após o início do cultivo. Soros de cavalo e de coelho também foram testados e apresentaram o mesmo efeito sobre a morfologia desta levedura.

Soro fetal bovino é o mais poderoso indutor da formação de hifas em *Candida albicans.* O componente do soro que promove esta mudança morfológica ainda não é conhecido. *Y. lipolytica* forma hifas verdadeiras em reposta ao soro fetal bovino e parece ser um sistema atrativo para o estudo da transição dimórfica através do soro (KIM *et al*., 2000).

4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

4.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: Peptona e Extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), Dextrose (Quimibrás – R.J., Brasil), Etanol P.A. (*Sigma-Aldrich CO,* MO, USA) e Agar bacteriológico (*Vetec* – R.J., Brasil).

O Soro Fetal Bovino foi obtido de *Sigma-Aldrich CO* (MO, USA), assim como, N- Acetilglucosamina e Tran-Trans Farnesol, 96% .

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga *Fanem* modelo *206-R, Excelsa Baby II*;
2) Estufa Nova Técnica;
3) Espectrofotômetro Shimadzu *UV 1800*;
4) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *Bioflux II 90 A Filtracom*;
5) Incubador com agitação (*shaker*) (Tecnal Digimec BTC9090);
6) Microscópio óptico Nikon Eclipse E 200;
7) Câmera Digital Samsung S860 8.1 mega pixels;
8) Ultra Freezer CL 120 -80V Cold-Lab;
9) Câmera Digital Photometric Cool Snap;
10) Banho Maria Cael;
11) Lupa Leica EZ4

4.3. Microrganismo

A levedura empregada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Figura 4.1).

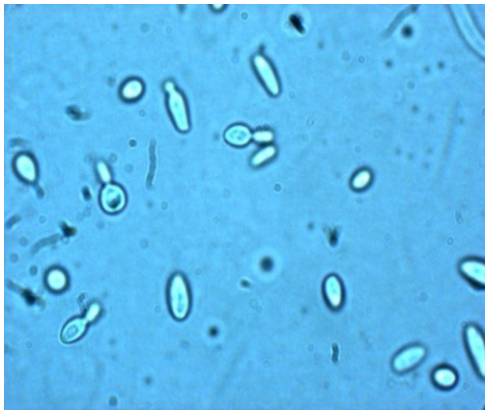

Figura 4.1. Imagem obtida a partir de microscópio ótico de uma amostra contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x).

4.4. Preservação

As células foram conservadas a 4ºC após 48 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD ("***Y****east Extract*, ***P****eptone*, ***D****extrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar-agar 2%.

4.5. Inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.4) inoculou-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL (Tabela 4.1). Após cerca de 48 horas em um incubador rotatório (*shaker*) a 28ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada para a determinação da concentração celular e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 10 minutos e

ressuspensas em 5 mL de meio de cultivo servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo.

4.6. Experimentos para indução da formação de hifas em meio líquido

4.6.1 Descrição dos experimentos

Os experimentos para indução de hifas foram iniciados com o inóculo descrito no item 4.5. Foram utilizados *Erlenmeyers* de 500 e 250 mL com 200 e 100 mL de meio líquido, respectivamente. A temperatura usada em todos os experimentos foi de 28ºC em incubador rotatório (*shaker*) em velocidades de agitação entre 60 e 160 rpm. Tais velocidades de agitação foram utilizadas a fim de se verificar a influência da dispersão do oxigênio na formação de hifas pela levedura e nas variáveis de cultivo estudadas (crescimento celular e consumo de substrato). Esses experimentos foram realizados por 24 horas, com amostragem de hora em hora durante as 8 primeiras horas de experimento para a determinação do crescimento celular e da concentração de glicose, nos meios em que a glicose é utilizada como fonte de carbono. A formação de hifas foi detectada em amostras de 0, 5, 7, 15 e 24 h de experimento através do processamento digital de imagens obtidas em microscópio ótico com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, como será descrito no item 4.9.3. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, visando à reprodutibilidade dos resultados.

4.6.2 Meios de cultivo

Foram utilizados meios com diferentes fontes de carbono, meio mínimo (ausência de fonte de carbono e quantidades mínimas de peptona e extrato de lêvedo) e meios contendo 10% de soro fetal bovino (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Composição do meio de cultivo dos experimentos para indução da formação de hifas em meio líquido.

Meios	*Glicose*	*Peptona*	*Extrato de Lêvedo*	*N- Acetil glucosamina*
Meio YPD	2%	1%	1%	0
Meio YPD*	1%	0,64%	1%	0
Meio YP	0	0,64%	0,50%	0
Meio YPN	0	0,64%	0,50%	0,50%

O meio YPD* é o meio YPD (1% de extrato de lêvedo, 1% de peptona, 2% de glicose, p/v) modificado, ou seja, com concentração de 0,64% (p/v) de peptona. Nesse meio é utilizada a concentração mínima de peptona necessária para o crescimento celular devido ao alto custo desse composto e a concentração de glicose é de 1% com o objetivo de diminuir as oscilações de consumo de glicose observadas em trabalhos anteriores (KAWASSE *et. al*, 2003).

4.6.3 Planejamento experimental

Para determinar a melhor concentração de soro fetal bovino e a melhor agitação a ser utilizada para a formação de hifas foi utilizado o método do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^k, com k = 2, com o uso do *software Statistics* versão 7.0.4. Os fatores adotados como variáveis independentes estão descritos na Tabela 4.2.

Os experimentos foram realizados em frascos de *Erlenmeyer* de 500mL, contendo 200 mL de meio YP, a 28°C, em incubador rotatório por 24 h, com amostragem para a observação e quantificação da morfologia celular em 0, 15 e 24 h de experimento.

A variável resposta para a determinação das melhores condições de formação de hifas foi o aumento de hifas formadas após 15 h de experimento. Este parâmetro foi determinado através do processamento digital de imagens obtidas em microscópio ótico com auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, como será descrito no item 4.9.3.

Tabela 4.2. Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental 2^k, com k = 2

Variáveis	*Nível*				
	-1,41	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
Soro Fetal Bovino (%)	0	1,74	6	10,26	12
Agitação (rpm)	60	74,5	110	145,5	160

A Tabela 4.3 apresenta os experimentos realizados no planejamento experimental. Foram utilizados dois pontos centrais.

Tabela4.3. Experimentos gerados pelo *software Statistics* 7.0. Código das variáveis independentes do planejamento experimental 2^k, com k = 2

Ensaio	***Soro Fetal Bovino***	***Agitação***
1	-1	-1
2	-1	1
3	**1**	**-1**
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	-1,41	0
10	1,41	0

4.7. Experimentos para indução da formação de hifas em meio sólido

Foram realizados experimentos sem indutor de formação de hifas e experimentos contendo soro fetal bovino em meio sólido. A composição dos meios está descrita na Tabela 4.4. Após o preparo das placas de petri, em capela de fluxo laminar, a levedura foi semeada através da técnica de esgotamento. A técnica de semeadura por esgotamento consiste em espalhar o material com o auxílio de uma alça bacteriológica, previamente flambada, fazendo estrias sucessivas até o esgotamento do material, de modo a obter-se um perfeito isolamento das leveduras existentes na amostra, que após a incubação, formarão as colônias isoladas sobre a superfície do ágar. (Figura 4.2).

Tabela 4.4. Composição do meio de cultivo dos experimentos em meio sólido.

Meios	*Glicose*	*Peptona*	*Extrato de Lêvedo*	*N- Acetil glucosamina*	*Soro Fetal Bovino*	*Ágar bacterológico*
Meio YPD	2%	2%	1%	0	0	2%
Meio YPD/ SFB	2%	2%	1%	0	10%	2%
Meio YPN	0	2%	1%	1%	0	2%

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 48 h. Em seguida, a morfologia colonial foi registrada com lupa (aumento de 40x) e câmera fotográfica digital Samsung S860 8.1 mega pixels. As amostras para análise da morfologia celular foram retiradas com alça bacteriológica, ressuspensas em água destilada e observadas em microscópio óptico.

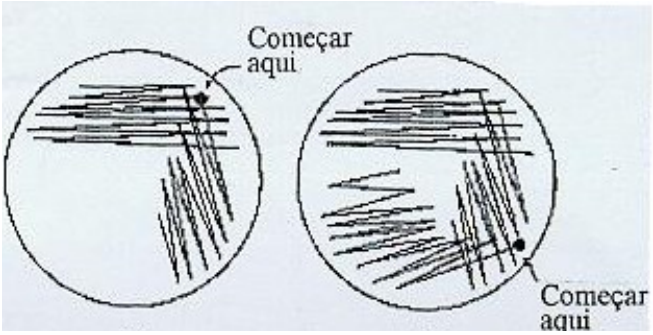

Figura 4.2. Semeadura por esgotamento em placa: segundo e terceiro conjunto de estrias

4.8 Experimentos para inibição da formação de hifas

Foram realizados experimentos controle, nos quais se induziu a formação de hifas com soro fetal bovino, e experimentos com soro fetal bovino e farnesol (utilizado para o estudo da inibição da formação de hifas). A composição dos meios líquidos e sólidos está decrita nas Tabelas 4.1 e 4.4.

O farnesol foi adicionado aos meios de cultivo, atavés de soluções alcoólicas, em diferentes concentrações (Tabela 4.5). Estas soluções foram preparadas em etanol P.A, para solubilização do farnesol. A partir da solução estoque de *trans-trans* farnesol foi feita uma diluição em etanol, na concentração de 600 mM e esta solução foi adicionada em diferentes volumes ao meio de cultivo para alcançar a concentração final

desejada. Além disso, o mesmo volume do diluente puro (etanol) foi utilizado nos experimentos controle (sem adição de farnesol). As condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente. Foram utilizados *Erlenmeyers* de 500 e 250 mL, com 200 e 100 mL de meio de cultivo agitados a 60 rpm, a 28°C por 24 h.

Para os cultivos em meio sólido foram utilizadas placas de petri contendo o meio sólido, que foram incubadas em estufa a 28°C por 48 h. Foram retiradas amostras dos meios líquidos para determinação de crescimento celular e para a análise da morfologia em 0, 15 e 24 h de experimento. Nos meios sólidos, a morfologia colonial foi registrada com câmera fotográfica digital e a morfologia celular foi observada em microscópio óptico. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, visando à reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4.5. Concentrações de farnesol adicionadas aos meios de cultivo

Meios	***Farnesol (µM)***
Meio Líquido	300/ 600/ 900/ 1200
Meio Sólido	600

4.9 Esterilização

Todos os componentes do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos. O soro fetal bovino (estéril) foi manipulado em capela de fluxo laminar para ser adicionado ao meio de cultivo.

Os *erlenmeyers*, as ponteiras, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 15 minutos.

4.10 Métodos Analíticos

4.10.1 Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 4.3. A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada até peso constante. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então mede-se a absorvância em espectrofotômetro a 570 nm, obtendo-se a curva de peso seco.

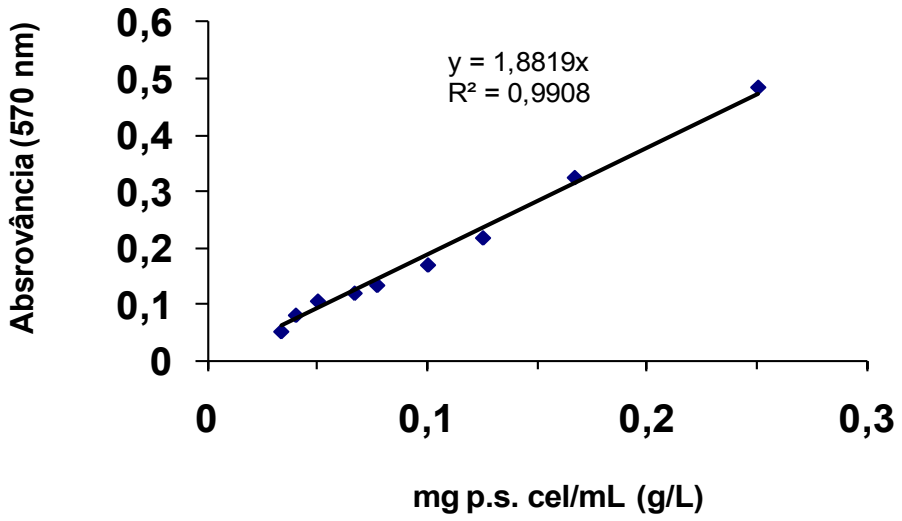

Figura 4.3. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu.

4.10.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para medida colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH - Germany*).

Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 15 µL de amostra e completa-se com 1500 µL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10min a 37°C, sendo a absorvância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL^{-1} e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L^{-1}; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L^{-1}; Fenol 0,75 mmol.L^{-1}; Glicose oxidase 15000 U.L^{-1}; Peroxidase 1500 U.L^{-1}; Mutarotase 2000 U.L^{-1}.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da equação 4.1:

$$C = 100 * \left(\frac{Aa}{Ap} \right) \tag{4.1}$$

onde:

Aa = Absorvância da amostra;

Ap = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL^{-1})

4.10.3 Processamento digital de imagens

As imagens obtidas em diferentes pontos dos experimentos foram registradas através da utilização de um microscópio óptico Nikon Eclipse E 200 com uma câmara de fotografia digital Photometric Cool Snap acoplada. A ampliação utilizada foi de 400x do microscópio óptico e 4x do *zoom* óptico da máquina fotográfica digital, que perfaz uma ampliação de 1600x. As imagens registradas foram posteriormente tratadas através da medição do alongamento das células com uma rotina computacional desenvolvida

em Matlab® 7.0.4. Para cada ponto experimental foram registradas em torno de 10 imagens.

O programa de tratamento de imagens é altamente preciso quando comparado à quantificação manual e é dividido em três componentes principais: a binarização das imagens obtidas, a quantificação das micelas (para este trabalho, quantificação das células leveduriformes e em forma de hifas) e o cálculo de parâmetros estatísticos (FREIRE *et. al*., 2005).

A binarização consiste na conversão da imagem obtida RGB (red- green- blue) para uma imagem a preto e branco, com o seu subsequente tratamento de forma a eliminar possíveis ruídos (Figura 4.4). Esta parte é efetuada de forma a transformar uma matriz a três dimensões em uma matriz a duas dimensões composta simplesmente por elementos 0's (pixeis *off*) e 1's (pixeis *on*), facilitando muito o seu posterior tratamento e quantificação dos objetos em causa. A segunda componente do programa efetua a quantificação das células, apresentando como resultado o alongamento (A) das células. Por último existe uma componente que reúne os dados de um determinado número de imagens já quantificadas anteriormente e dá um resultado final de diâmetro médio e alongamento e ainda dois histogramas acerca do alongamento e da distribuição de tamanhos das células.

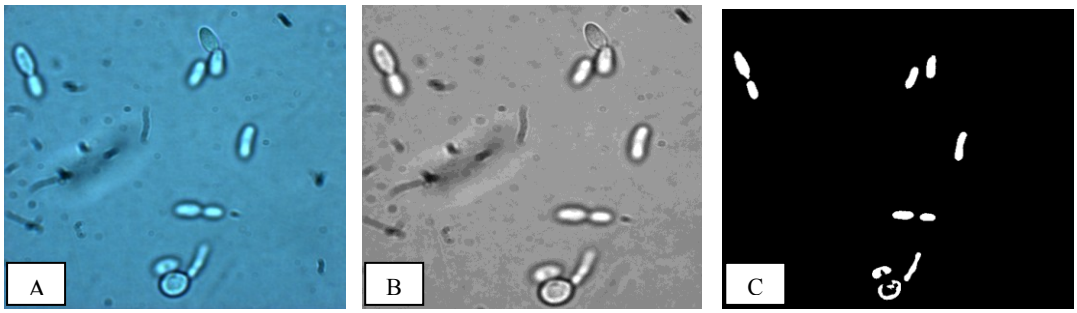

Figura 4.4. Sequência da binarização. (A) imagem RGB obtida com microscópio óptico; (B) imagem em preto e branco; (C) imagem binarizada**.**

A quantificação das células fornece o diâmetro médio e o alongamento médio das imagens tratadas. O comprimento das hifas e a largura das hifas foram identificadas como diâmetro de *Feret* máximo (Fmax) e diâmetro de *Feret* mínimo (Fmin), respectivamente. O diâmetro de *Feret* é dado pela distância entre duas tangentes paralelas em qualquer direção dada. O alongamento (A) é dado pela razão entre o

comprimento das hifas e a sua largura, ou seja, a razão entre Fmax e Fmin (KAVASSE *et al*., 2003), como mostra a equação 4.2:

$$A = \frac{F\max}{F\min} \quad (4.2)$$

Neste trabalho, foram quantificadas individualmente células de diferentes tamanhos para que pudesse ser determinado a partir de qual valor de alongamento uma célula seria considerada hifa. Foram consideradas hifas células com alongamento superior a 2,0 (Figura 4.5).

A metodologia adotada neste trabalho para determinar o que é forma leveduriforme e em qual tamanho a célula passa a ser considerada uma hifa é semelhante à descrita por O'Shea & Walsh (2000). Em estudos de morfologia O'Shea & Walsh (*op. cit*.) definiram tamanhos e formas para as células de *Kluyveromyces marxianus* NRRLy2415.

O uso da análise de imagens para quantificar as formas morfológicas de organismos resulta em dados consistentes, reprodutíveis e livres da variabilidade do observador (O'SHEA & WALSH, 2000).

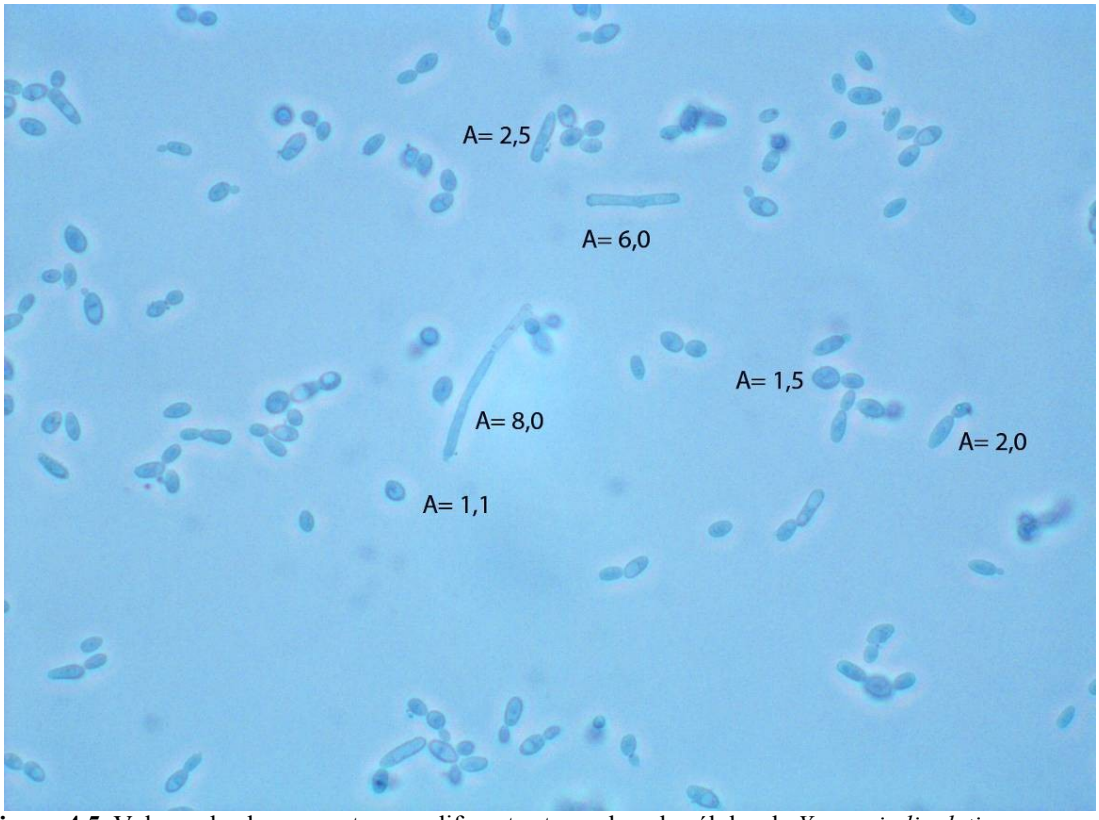

Figura 4.5. Valores de alongamento para diferentes tamanhos de células de *Yarrowia lipolytica*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de estudar a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica*, inicialmente foi realizado um estudo do comportamento dessa levedura em diferentes meios de cultura contendo alguns indutores da formação de hifas, a fim de se obter um meio de cultivo com um grande percentual de hifas para, em seguida, avaliar a capacidade do farnesol em inibir sua formação.

Vários relatos na literatura mencionam N-acetilglicosamina como uma fonte de carbono capaz de induzir a transição da forma de levedura para a forma micelial (GUEVARA-OLVERA *et al*., 1993; HURTADO & RACHUBINSKI, 1999; HURTADO *et al*., 2000; RUIZ-HERRERA & SENTANDREU, 2002). Perez-Campos & Dominguez (2001) obtiveram um sistema reproduzível para a obtenção da transição levedura-hifa com 1% de N-acetilglicosamina. Segundo Kim *et al*. (2000), em N-acetilglicosamina a levedura forma hifas, mesmo sem a presença de um indutor. Portanto, utilizou-se o meio YPN, no qual glicose foi substituída por N-acetilglicosamina, como fonte de carbono.

Os mesmos trabalhos mostram soro fetal bovino como um bom indutor da formação de hifas (KIM *et al*., 2000; PÉREZ-CAMPO & DOMINGUEZ, 2001). Portanto, testou-se a adição desse componente no meio de cultivo.

5.1 Avaliação do cultivo de *Yarrowia lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono

Para determinar o comportamento de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) frente a diferentes fontes de carbono foi realizado um estudo do seu cultivo em meio contendo, como fonte de carbono, 1% de glicose e em meio com 1% de N-acetilglicosamina, sob agitação de 160 rpm em agitador rotatório.

É possível observar na Figura 5.1 que, no meio contendo glicose como fonte de carbono, houve um crescimento celular durante 8 h muito similar ao crescimento no meio contendo N-acetilglicosamina. A variação da concentração de biomassa nos dois meios de cultivo foi praticamente a mesma. Na presença de N-acetilglicosamina pode ser observada uma pequena fase lag (1 h). Isso deve-se, provavelmente, a uma

adaptação das células ao meio com esta fonte de carbono, já que, inicialmente, no meio de inóculo, as células foram cultivadas em meio contendo glicose. Na Figura 5.1 isso é facilmente observado quando comparamos com o crescimento em glicose, onde não houve necessidade de adaptação das células e não apresenta, portanto, fase lag.

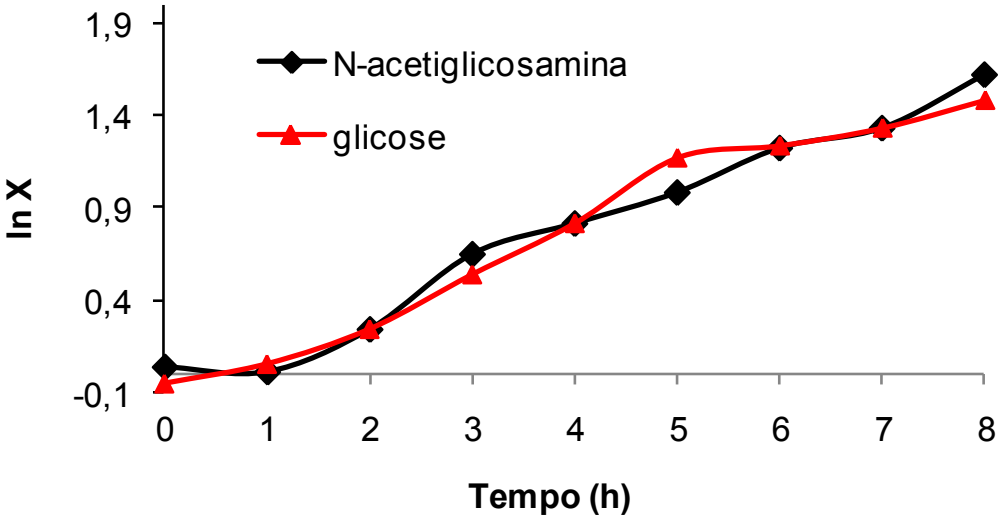

Figura 5.1. Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono.

Comparando as taxas específicas de crescimento celular (μ) calculadas durante a fase exponencial do crescimento para a cinética realizada na presença de glicose e na presença de N-acetilglicosamina, é possível observar que o cultivo que apresentou maior μ foi o que continha glicose como fonte de carbono, como é apresentado na Tabela 5.1. Comparando os resultados, observa-se que apesar dos perfis de crescimento serem muito próximos, a troca da fonte de carbono alterou ligeiramente o crescimento celular.

Tabela 5.1. Taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de diferentes fontes de carbono.

Fonte de Carbono	$\mu(h^{-1})$
Glicose	0,282 ± 0,02
N- acetilglicosamina	0,251± 0,01

No crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono foram realizadas dosagens de glicose pelo método enzimático e observadas oscilações na concentração de glicose em pequenos intervalos de tempo. Kawasse

(2001) constatou estas oscilações utilizando diferentes métodos de dosagem de glicose: o método descrito por Nelson (1944), glicose oxidase (Kit enzimático, Merck) e CLAE (Cromatografia líquida de alta performance). Isso se deve, provavelmente, a ciclos fúteis existentes durante a glicólise para este microrganismo (Figura 5.2.).

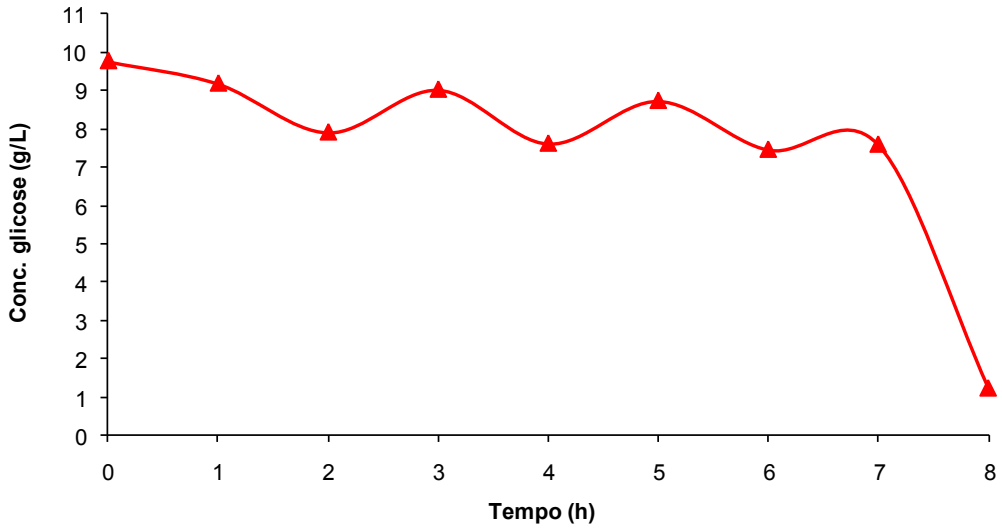

Figura 5.2. Cinética de consumo de glicose extracelular para o cultivo de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono.

Análises da morfologia celular foram realizadas em 0, 5, 7 e 24 h de experimento, através de amostras do meio de cultivo, que foram observadas em microscópio ótico (aumento de 400x) e registradas através de imagens por uma câmera digital acoplada ao microscópio. Porém foram encontradas raras hifas nessas condições. Observou-se nas imagens obtidas, que a levedura *Y. lipolytica* apresentou-se predominantemente na forma oval na presença das duas fontes de carbono. Portanto, não foi realizado o processamento digital das imagens.

5.2 Avaliação do efeito de soro fetal bovino no cultivo de *Yarrowia lipolytica*

Soro fetal bovino é comumente utilizado como indutor da transição levedura-micélio (KIM *et al.*, 2000; PÉREZ-CAMPO & DOMINGUEZ, 2001). Para avaliar o seu efeito sobre *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) foram realizados estudos sobre o crescimento celular e a morfologia, durante 8h de cultivo, a 160 rpm. O meio de cultivo utilizado para estes experimentos foi meio YPD* (contendo 1% de glicose). Foram

realizados experimentos controle (isento de soro fetal bovino) e com 10 % de soro fetal bovino.

Os resultados obtidos mostram que o soro fetal bovino afetou ligeiramente a formação de biomassa quando comparamos com o resultado obtido no meio isento deste indutor (Figura 5.3). A taxa específica de crescimento celular foi menor no cultivo contendo soro fetal bovino. Isto provavelmente ocorre pois as células precisaram de uma maior fase de adaptação (fase lag) ao soro fetal bovino, o qual pode apresentar constituintes mais complexos para o metabolismo da levedura. Entre os constituintes do soro fetal bovino estão: albumina, globulina e uréia. (CULTLAB, bula. Disponível em http://www.cultilab.com.br/paginas/meiotransf. Acesso em 04 mar. 2011).

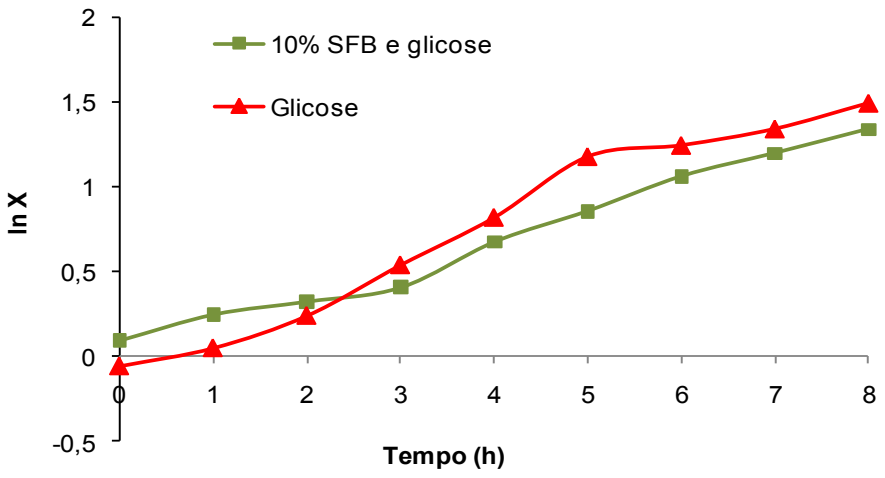

Figura 5.3. Cinética de crescimento celular de *Y.lipolytica* em meio contendosomente glicose e em meio com 10% de soro fetal bovino e glicose.

Foi avaliada a utilização de soro fetal bovino como fonte de carbono em um meio isento de glicose, como mostra a Figura 5.4.

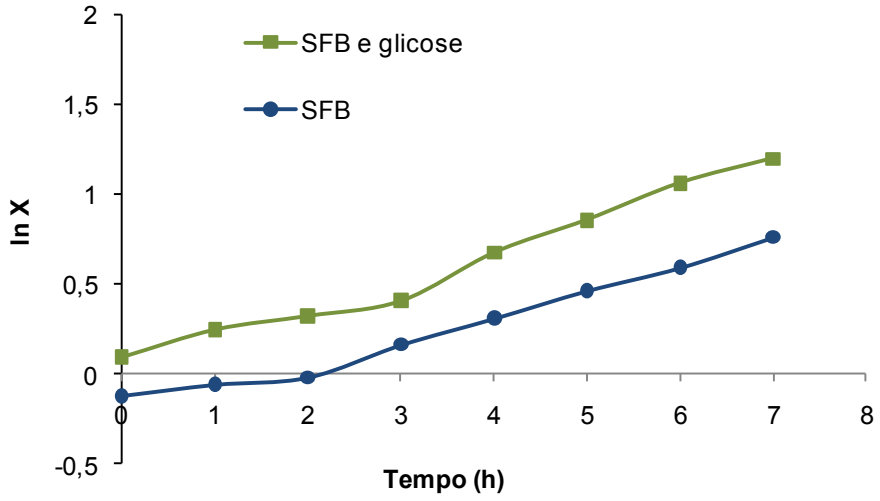

Figura 5.4. Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de 10% de soro fetal bovino (SFB) em meios com e sem glicose.

Apesar da taxa específica de crescimento ter diminuído bastante em relação ao cultivo que apresentava glicose (Tabela 5.2), houve um discreto crescimento celular. Portanto, a levedura está utilizando algum constituinte do soro como fonte de carbono, mas seu metabolismo é lento.

Tabela 5.2. Taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença de soro fetal bovino em meios com e sem glicose.

Fonte de Carbono	***$\mu(h^{-1})$***
Glicose	0,282± 0,02
Soro fetal bovino	0,152± 0,05
SFB e Glicose	0,192± 0,05

Durante o crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo a associação soro fetal bovino e glicose, também foram observadas oscilações na concentração de glicose, mas em menor magnitude (Figura 5.5). Provavelmente a levedura está com o metabolismo mais lento, devido a sua adaptação ao novo componente do meio e também pode estar utilizando outras substâncias, além da glicose, como fonte de carbono.

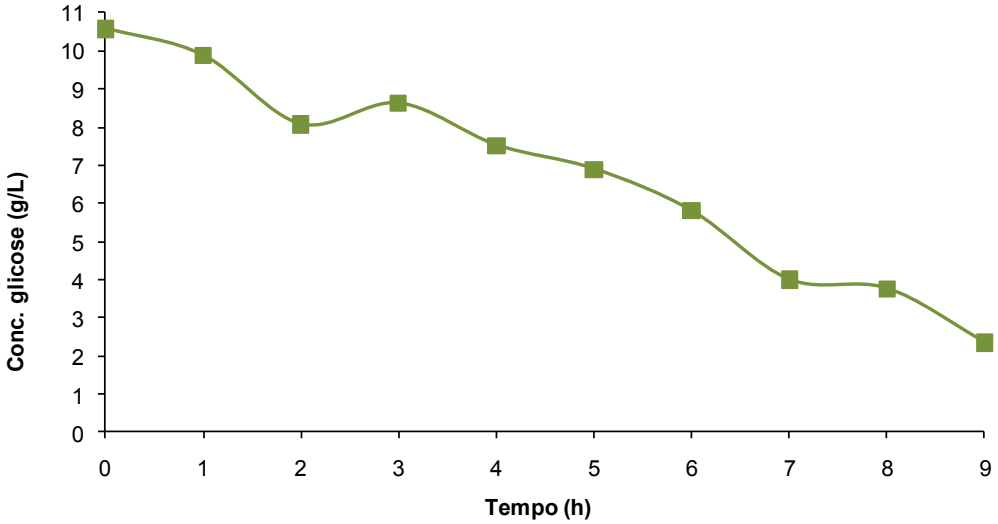

Figura 5.5. Cinética de consumo de glicose extracelular para o cultivo de *Y. lipolytica* na presença de 10% de soro fetal bovino.

Para os cultivos na presença de soro fetal bovino nas condições estudadas até então, observou-se nas imagens obtidas, que a levedura *Y. lipolytica* apresentou-se predominantemente na forma oval na presença das duas fontes de carbono. Portanto, não foi realizado o processamento digital das imagens.

5.3 Planejamento experimental: delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2

Um planejamento experimental completo DCCR 2^2 foi realizado com o objetivo de analisar a interação entre a agitação do cultivo e a concentração de soro fetal bovino na formação de hifas de *Yarrowia lipolytica*. Para tal foi utilizado o *software Statistica* 7.0.4. O meio utilizado para todos os experimentos foi o meio YP (0,64% de peptona e 0,5% de extrato de lêvedo), sem a presença de fonte de carbono, com o objetivo de eliminar sua influência na formação das hifas. Os níveis mínimo e máximo utilizados para a agitação foram 60 e 160 rpm, respectivamente. Para a concentração de soro fetal bovino foi utilizada a faixa de 1,74% a 12% (v/v).

Para remover o efeito da aleatoriedade inicial do cultivo (em relação a presença de hifas) e analisar apenas o efeito da agitação do cultivo e da concentração de soro na

formação de hifas, foi utilizado o parâmetro "aumento relativo de hifas" (H), aqui definido segundo a equação 5.1:

$$H = \frac{H_{\max} - H_{0h}}{H_{0h}} \tag{5.1}$$

onde, H_{max} é a maior porcentagem de hifas formadas durante um determinado experimento (as amostras foram coletadas em 15 h de experimento) e H_{0h} é a porcentagem inicial de hifas do mesmo experimento. O percentual de hifas é determinado pelo processamento digital de imagens, considerando hifa como sendo as células (ou objetos) que apresentam um alongamento maior que 2.

Os resultados do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 5.3. O maior número de hifas foi obtido em baixas agitações, independente da concentração de soro adicionada. O ensaio 7 apresentou a maior formação de hifas após 15 h de cultivo, sendo que apresentava somente 4,7% de hifas no início do cultivo e ao final de 15h apresentou 32%. Em seguida, o ensaio 1 apresentou, em 0 h, 4,73% de filamentos e chegou a uma máxima formação em 15 h , com 29%.

Tabela 5.3 Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2, com os valores codificados e reais e os resultados experimentais

Ensaio	***Agitação***		***Concentração Soro Fetal Bovino***		***H[a]***
	Código	Valor (rpm)	Código	Valor (%)	
1	-1	74,5	-1	1,74	5,13
2	1	145,5	-1	1,74	0,03
3	-1	74,5	1	10,26	4,13
4	1	145,5	1	10,26	1,17
5	0	110,0	0	6,00	0,70
6	0	110,0	0	6,00	0,65
7	-1,41	60,0	0	6,00	5,81
8	1,41	160,0	0	6,00	0,86
9	0	110,0	-1,41	0	0,89
10	0	110,0	1,41	12,00	1,40

[a]H: aumento relativo de hifas. $H=(H_{max} - H_{0h})/H_{0h}$.

A partir dos resultados da Tabela 5.3, utilizando o *software Statistica*, foi possível obter o gráfico de pareto (Figura 5.6) que indica os parâmetros que influenciam a resposta com 95% de confiança. Analisando o gráfico, observa-se que a variável independente agitação (efeito linear, L) foi a que apresentou um maior efeito

significativo sobre a variável de resposta e teve um efeito negativo, ou seja, o aumento da agitação conduz a uma diminuição na formação de hifas. O fator correspondente ao efeito quadrático da agitação também influenciou a variável reposta, mas de forma positiva. Os resultados mostram que a concentração de soro fetal bovino não foi uma variável estatisticamente significativa. No entanto, a interação agitação/concentração de soro fetal bovino foi estatisticamente significativa com um efeito positivo sobre a formação de hifas.

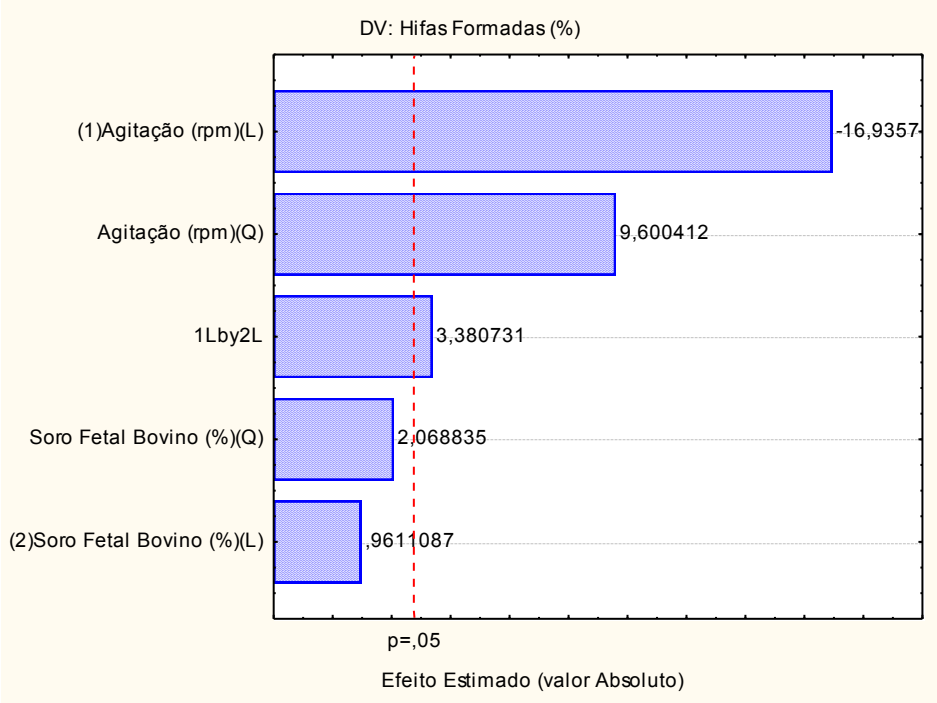

Figura 5.6 Diagrama de Pareto para o delineamento composto central rotacional.

Constata-se que para *Y. lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) o fator que exerce maior influência para a formação de hifas é a agitação, que pode ser devido à baixa tensão de O_2. Em condições de operação com elevada agitação, a concentração de oxigênio dissolvido é maior, e como já foi mencionado na revisão bibliográfica, *Y. lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio. Portanto, apresenta-se predominantemente na forma oval quando submetido a altas agitações.

O'Shea & Walsh (2000) estudaram a morfologia da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* em diferentes condições de cultivo, através do tratamento de imagens, e constataram que esta levedura apresentava sua morfologia primária na forma oval e esta morfologia aparecia principalmente em condições ideais de substrato e

oxigenação. Fazendo uma comparação com o resultado encontrado neste trabalho, é possível que *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) também apresente como morfologia primária a forma oval.

O efeito da baixa agitação do cultivo também foi constatado através da observação do aspecto do meio de cultura após 15 h de crescimento. Nos cultivos submetidos à baixa agitação formou-se uma camada fina e uniforme de células na superfície do meio. À medida que eram feitos ensaios em maiores agitações foi observada a diminuição da formação desta camada de células, e em ensaios com agitação superior a 100 rpm, esta camada de células desapareceu. Microscopicamente, esta camada superficial de células era formada por um conjunto de células na forma de hifas e na forma oval (Figura 5.6.). Amaral (2003) realizou estudo do efeito da aeração no cultivo de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682), utilizando perfluorocarbonetos (PFC) para aumentar a transferência de oxigênio no meio de cultivo e constatou que, como aeróbio estrito, essa levedura é carente em oxigênio e, portanto, tende procurar a melhor disponibilidade desse gás. A formação desta camada superficial de células deve-se ao fato de na superfície do meio de cultura haver uma maior disponibilidade de oxigênio.

Condições semi-anóxias em meios líquido e sólido induzem a formação de longas hifas pela levedura *Y. lipolytica* e, além disso, apresenta, quando cultivada em tubos capilares, um tropismo pelo oxigênio (HERRERA & SENTRANDEU, 2009).

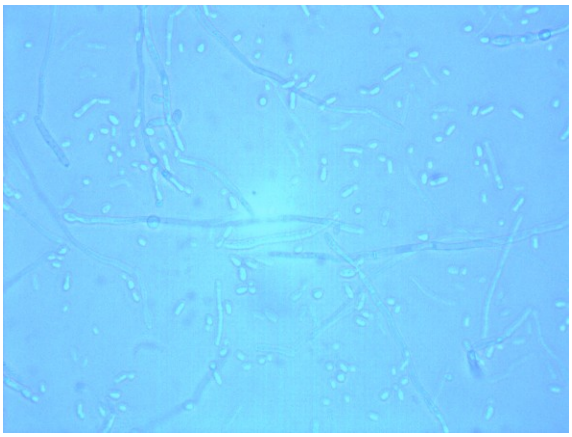

Figura 5.7. Foto de microscopia óptica em aumento de 400x de amostra retirada da camada superficial do meio de cultivo sob baixa rotação.

Pérez-Campo & Dominguez (2001) não detectaram dependência da formação de hifas em relação à concentração de soro fetal bovino. Além disso, observaram que as

quantidades de micélio formadas sob a ação do soro foram iguais às obtidas com N-acetilglicosamina.

Tendo sido observado que *Y. lipolytica* formou maior número de hifas quando submetida a baixas agitações, os experimentos para a formação de hifas foram realizados a 60 rpm. É importante lembrar que foram consideradas hifas células com alongamento superior a 2,0, como mostrado anteriormente na Figura 4.5.

5.4 Indução da formação de hifas em sistemas sob baixa rotação

5.4.1 O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica*

Nestes experimentos foram utilizados meios contendo glicose (YPD*) e N-acetilglicosamina (YPN), a 28°C. O tempo total dos experimentos foi de 24 h. As amostras para determinação de crescimento celular e para o processamento digital de imagens foram coletadas em 0, 15 e 24 h.

Na presença de glicose, *Y. lipolytica* apresentou predominantemente a forma leveduriforme (alongamento < 2,0) em todos os pontos experimentais analisados (0 h, 15 h e 24 h), como é possível observar na Figura 5.8. Inicialmente o cultivo apresentava 20% de células com alongamento (A) menor que 1,5 e 60% entre 1,5 e 2,0. Com o decorrer do cultivo (15 e 24 h), houve um aumento do percentual de células com menor alongamento (alongamento < 1,5) e redução do percentual de células com alongamento entre 1,5 e 2,0, tendendo a uma uniformidade, sempre mantendo o percentual de células sob a forma de hifas em 20%. Portanto, há uma tendência à formação de células mais circulares na presença de glicose, não sendo assim, uma fonte de carbono indutora da formação de hifas.

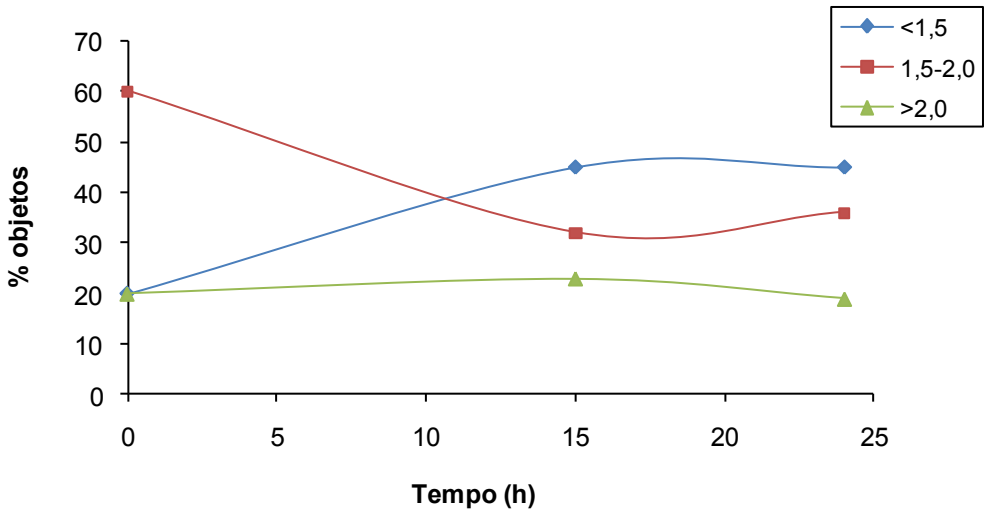

Figura 5.8. Perfil de alongamento para as células de *Yarrowia lipolytica* na presença de glicose como fonte de carbono, nos pontos 0, 15 e 24h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.

Para o cultivo na presença de N-acetilglucosamina (1 %), realizado sob agitação de 60 rpm, é possível observar que no início (0 h) tem-se um mesmo perfil de alongamento (Figura 5.9) que o cultivo com glicose como fonte de carbono. É importante lembrar que nesse momento as células estão sob efeito do pré-inóculo, ou seja, do meio contendo glicose a 2%. Com a continuidade do cultivo na presença de N-acetilglicosamina, observou-se um aumento no percentual de células com alongamento maior que 2 (de 20% em 0 h para 45% em 15 h), ou seja, um aumento no percentual de células sob a forma de hifas e, em seguida (24 h) uma pequena redução nesse percentual (40%) foi observada (Figura 5.9). Portanto, houve maior formação de hifas após 15 h de cultivo na presença de N-acetilglicosamina. Estes resultados mostram que a N-acetilglicosamina contribui para a formação de hifas.

A resposta obtida neste estudo é semelhante à obtida em trabalhos anteriores. Guevara-Olvera *et al.* (2003) observaram que na presença de glicose as células apresentavam-se predominantemente na forma oval e que N-acetilglicosamina induzia a transição para micélio, obtendo cerca de 55% de hifas em 12 h de experimento com esta fonte de carbono. O menor número de hifas formadas no presente estudo pode ser devido a diferença de cepa da levedura. Zinjarde *et al.* (1998) estudaram duas cepas de *Y. lipolytica* e também relataram a formação de quantidades diferentes de micélio entre uma e outra, pois algumas cepas apresentam maior facilidade de formar hifas que outras. Zinjarde *et al.*(*op. cit.*) só obtiveram hifas após 96 h de experimento.

Pérez-Campo & Dominguez (2001) estudaram o dimorfismo em *Y. lipolytica* na presença de 1% de glicose, 1% de N-acetilglicosamina, de 4% de soro fetal bovino e com a associação soro fetal bovino e glicose. No meio contendo somente glicose, não obtiveram a formação de hifas. Nos demais meios observaram ótima formação de hifas após 12 h de cultivo.

Zinjarde *et al.* (1998) obtiveram formação de micélio em meio contendo N-acetilglicosamina em baixa tensão de O_2 e na presença de atmosfera de CO_2 ou N_2. Esta formação diminuiu 15 a 20% quando a N-acetilglicosamina foi substituída por glicose.

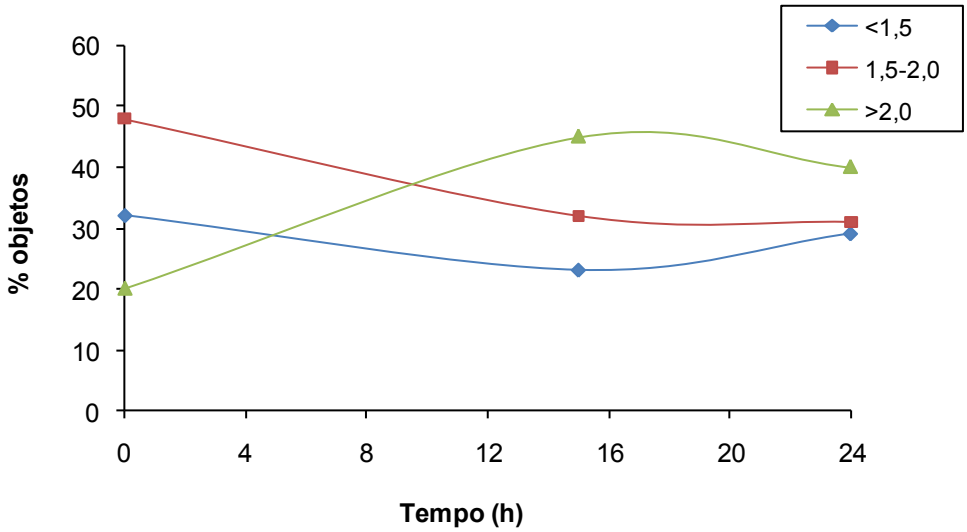

Figura 5.9. Perfil de alongamento para as células de *Y. lipolytica* na presença de N-acetilglicosamina como fonte de carbono, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.

5.4.2 O Efeito do Soro Fetal Bovino sobre a Morfologia Celular de *Yarrowia lipolytica*

Foram realizados experimentos em meios contendo glicose (YPD*) e em meios sem glicose (YP), a uma agitação de 60 rpm. A concentração de soro fetal bovino utilizada para os experimentos foi de 10%. Foram coletadas amostras para o processamento digital de imagens em 0, 15 e 24 h.

Nos cultivos realizados com soro fetal bovino e na ausência de glicose o percentual de hifas (alongamento maior que 2,0) era de 18% no início do cultivo (0 h, Figura 5.10) e passou para 43% após 15h de crescimento (Figura 5.10). Este resultado é muito próximo ao obtido nos experimentos utilizando N-acetilglicosamina como fonte de carbono. Após 24 h de cultivo, o percentual de hifas reduziu para 35% (Figura 5.10). Isso provavelmente deve-se ao esgotamento do soro fetal bovino no meio de cultivo,

uma vez que este componente pode estar sendo usado pela levedura como fonte de carbono.

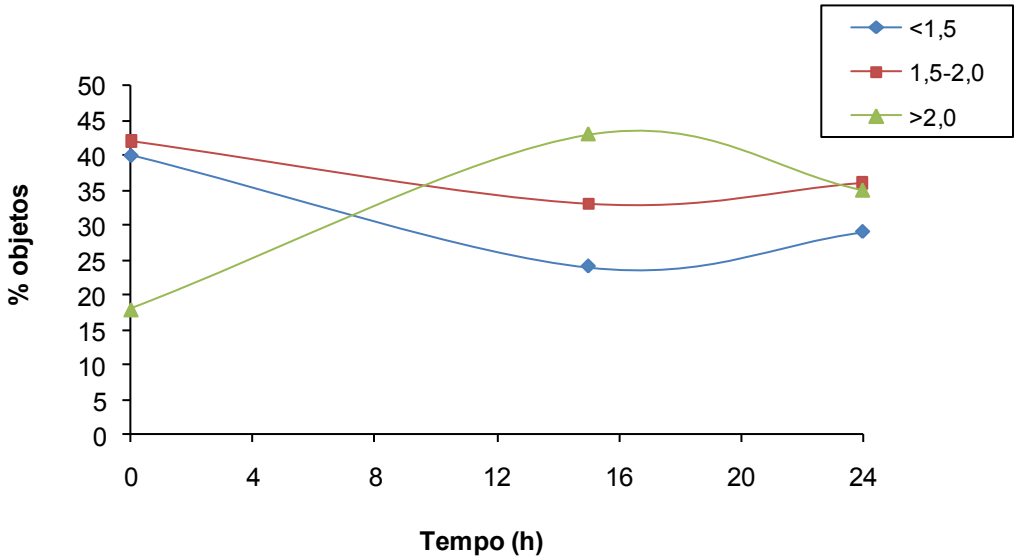

Figura 5.10. Perfil de alongamento para as células de *Y. lipolytica* na ausência de glicose e na presença de 10% de soro fetal bovino, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.

Nos experimentos realizados com soro fetal bovino na presença de glicose, inicialmente havia 20% de hifas (alongamento maior que 2,0) (Figura 5.11), como nos demais experimentos. Após 15 h de cultivo foi observada a formação de 41% de hifas, similarmente ao cultivo sem fonte de carbono. A formação de hifas parece ser independente da fonte de carbono, em baixa rotação. No entanto, após 24 h de cultivo, o percentual de hifas chegou a 57%. Possivelmente, a presença da glicose evitou o consumo do soro fetal bovino no meio de cultura e, portanto, em 24 h de cultivo o efeito indutor do soro fetal bovino na formação de hifas pôde ser ainda maior, já que as células ainda estavam em fase de crescimento celular.

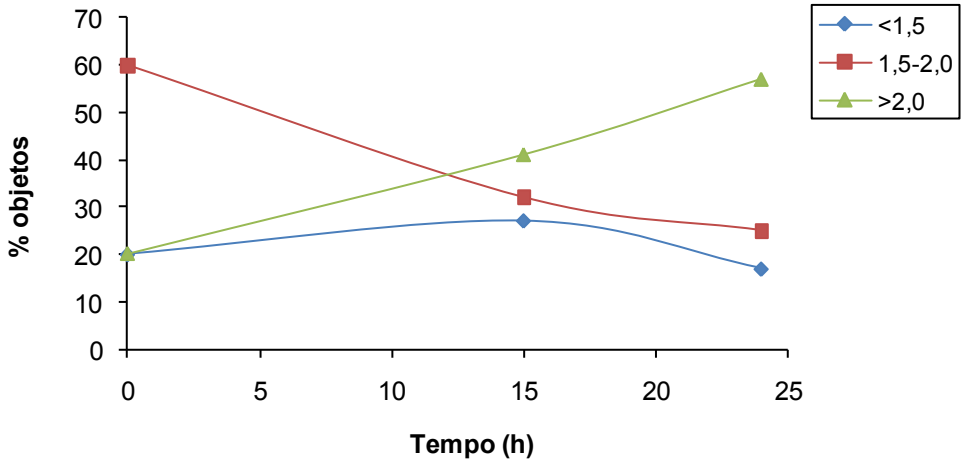

Figura 5.11. Perfil de alongamento para as células de *Y. lipolytica* na presença de glicose e de 10% de soro fetal bovino, nos pontos 0, 15 e 24 h do experimento realizado sob agitação de 60 rpm.

Pèrez-Campo & Dominguez (2001) realizaram estudos de indução de hifas em meio contendo 1% de glicose e 4% de soro fetal bovino. O início da formação de hifas ocorreu a partir de 4h de cultivo e cerca de 90% de hifas foram observadas em 6h de cultivo. O mesmo resultado foi obtido com N-acetilglicosamina.

Y. lipolytica apresenta excelente formação de hifas em meio contendo glicose e soro fetal bovino, a 60 rpm. Portanto, estas condições são as ideais para o estudo do efeito do farnesol sobre a morfologia desta levedura.

5.5 Avaliação do efeito de *trans-trans* farnesol no cultivo de *Yarrowia lipolytica*

Como o farnesol é uma molécula sinalizadora ("*quorum-sensing*", molécula QSM), que inibe a formação de hifas em *C. albicans* (HORNBY *et al.*, 2001; RAMAGE *et al.*, 2002; MOSEL *et al.*, 2005), este composto foi utilizado nos cultivos de *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682), nas condições em que se obteve maior formação de hifas, para verificar seu efeito inibitório para esta levedura. Portanto, foi realizado um estudo com diferentes concentrações de farnesol em cultivos na presença de soro fetal bovino ou N-acetilglicosamina agitados a 60 rpm.

Os meios escolhidos para os estudos com farnesol foram YPD*, o qual apresenta 1% de glicose, 1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona, adicionado de 10% soro fetal bovino e YPN (onde a glicose é substituída por 1% de N-acetilglicosamina, sem a

adição de soro fetal bovino). O critério para a escolha dos meios de cultivo, assim como a agitação, foi a maior formação de hifas.

A solução alcoólica contendo farnesol foi adicionada aos meios YPD* (+ SFB) e YPN em quantidade suficiente para se obter as seguintes concentrações finais de farnesol: 300 μM ,600 μM ,900 μM e 1200 μM . A adição de farnesol foi feita no início do cultivo e os ensaios foram realizados a 28°C, por 24 h. Acompanhou-se o crescimento celular durante o cultivo e amostras para o processamento digital de imagens para avaliar a morfologia das células foram retiradas em 0, 15 e 24 h de cultivo.

A análise quantitativa da morfologia celular a partir dos valores de alongamento obtidos pelo processamento digital de imagens foi realizada através da porcentagem de hifas formadas (considerando hifa as células com alongamento maior que 2,0) ou do parâmetro "porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol" (I). Este parâmetro foi obtido através da equação 5.2, segundo Chiller *et al*. (2000):

$$I = \frac{H_{aus_farn} - H_{pres_farn}}{H_{aus_farn}} * 100 \qquad (5.2)$$

onde, H_{aus_farn} é o percentual de hifas na ausência de farnesol, ou seja, no meio de cultivo sem farnesol após 24 h de experimento, e H_{pres_farn} é o percentual de hifas no meio de cultivo correspondente, na presença de farnesol, após 15 e 24 h de cultivo. O percentual de hifas é determinado pelo processamento digital de imagens, considerando hifa como sendo as células (ou objetos) que apresentam um alongamento maior que 2.

5.5.1 Efeito de farnesol sobre a morfologia e o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na presença de soro fetal bobino

O crescimento celular foi acompanhado de hora em hora por 7 h e também foram coletadas amostras de 15 e 24 h, como é possível obervar na Figura 5.12. Analisando os resultados, pode-se verificar que o crescimento celular no experimento controle foi menor que o no cultivo anteriormente realizado a 160 rpm (Figura 5.3), devido à agitação utilizada. Sendo a *Y. lipolytica* uma levedura estritamente aeróbia, uma disponibilidade maior de oxigênio devido a maior rotação proporciona um melhor crescimento celular. Este efeito da disponibilidade de oxigênio pode ser também

constatado através da taxa específica de crescimento celular, que foi de 0,127h^{-1} para o experimento a 60 rpm e 0,192 h^{-1} para para o experimento realizado a 160 rpm.

Muitos trabalhos na literatura mostram que a agitação e a aeração são muito importantes para o metabolismo e o crescimento celular de *Y. lipolytica.* Inclusive a aeração do meio afeta também a produção de lípase. Corzo & Revah (1999) realizaram experimentos em *erlenmeyers* de 250 mL com volumes de meio de cultura de 30, 50 e 100 mL, com o objetivo de avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio. A produção de lipases foi melhor em maiores volumes de meio de cultura, devido à menor oxigenação do meio.

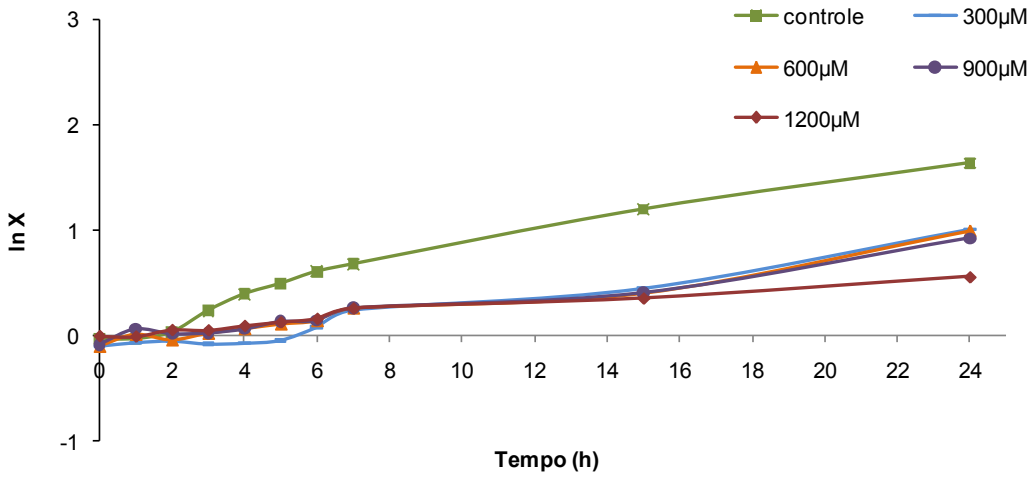

Figura 5.12. Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio YPD* com 10% de soro fetal bovino (experimento controle) e em meio YPD* com 10% de soro fetal bovino e diferentes concentrações de farnesol, com agitação de 60 rpm.

Farnesol, como já mencionado, é uma molécula QS para *C. albicans* e tem como efeito a inibição da transição dimórfica (HORNBY *et al.*, 2001; RAMAGE *et al.*, 2002; MOSEL *et al.*, 2005). Adicionalmente, o farnesol possui um efeito antagônico no crescimento celular de diferentes microrganismos (SEMIGHINI *et al.*, 2005).

O estudo da ação do farnesol sobre o cultivo de *Y.lipolytica* mostrou que existe um efeito negativo sobre o crescimento celular mediado por este sesquiterpeno (Figura 5.12.). Independente da concentração de farnesol utilizada neste estudo foi observada uma diminuição de µ (taxa específica de crescimento). A concentração final de células obtida em cada um dos experimentos com farnesol parece ter uma dependência com a concentração de farnesol utilizada, como mostra a Tabela 5.4. O ensaio realizado com

300µM de farnesol, apresentou a menor inibição do crescimento celular, com uma concentração final de células de 2,73g/L, enquanto que com a máxima concentração de farnesol utilizada (1200µM) foi obtida uma concentração de 1,73g de células/L ao final de 24 h. Portanto, *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) apresenta-se sensível à concentração mínima de farnesol utilizada (300µM), na qual já é possível observar efeitos sobre o crescimento celular.

Tabela 5.4. Concentração final de células obtida após 24h de crescimento em diferentes concentrações de farnesol.

Farnesol (µM)	***$[X_f]^a$ (g/L)***
controle	5,11
300	2,73
600	2,67
900	2,50
1200	1,73

[a]$[X_f]$: concentração de células após 24 h de cultivo.

Existe uma grande variação na sensibilidade dos fungos ao farnesol e na amplitude das faixas de concentrações de farnesol necessárias para afetar a viabilidade e o crescimento de diferentes espécies. Em *Candida dublibiensis*, por exemplo, o nível de tolerância ao farnesol é de 500µM, enquanto que para *Paracoccidioides. brasiliensis* é de 5 a 20 µM (SOUZA SILVA, 2009). Para *C. dubliniensis,* Henriques *et al.* (2006) relataram que a uma concentração de 150 µM, o farnesol não apresentou inibição significativa sobre o crescimento celular.

Rossignol *et al.* (2007) estudaram o efeito exógeno de farnesol sobre *Candida parapsilosis* e observaram que 100 µM de farnesol foi capaz de inibir em 30% a formação de biofilme. A inibição do crescimento celular foi observada em concentrações de 50 µM e 10 µM, após duas horas da adição do farnesol em cultivo em meio líquido. Kim *et al*. (2002) obserervaram uma taxa de inibição de crescimento de 35% em *C. albicans* na presença de 450 µM de farnesol.

Ramage *et al.* (2002) observaram que novas células de *C. albicans* enxertadas em biofilmes maduros, na presença de altas concentrações de farnesol, não germinam. A faixa de estudo utilizada para as concentrações de farnesol foi de 30 a 300 µM, e, aparentemente, a partir de certo valor de concentração de farnesol não é possível

observar o crescimento micelial e o biofilme não é formado. Estas células, então, podem se separar e colonizar um novo substrato, livre de farnesol e formar um novo biofilme.

Em relação à transição dimórfica, os resultados obtidos pelo processamento digital de imagens mostram que o farnesol apresentou um grande efeito inibidor sobre a formação de hifas em todas as concentrações utilizadas (Figura 5.13). No experimento controle(com glicose e SFB e sem farnesol), o percentual máximo de hifas obtido foi de 57% em 24h de experimento. O efeito inibitório na formação de hifas foi dependente da concentração de farnesol utilizada. Com 300 µM de farnesol foi obtido 47% de hifas ao final de 24 h e esta formação de hifas foi diminuindo de forma proporcional ao aumento da concentração de farnesol. A menor porcentagem de hifas foi de 39%, com uma queda na porcentagem de hifas em torno de 31,6%, com a máxima concentração de farnesol utilizada (1200 µM).

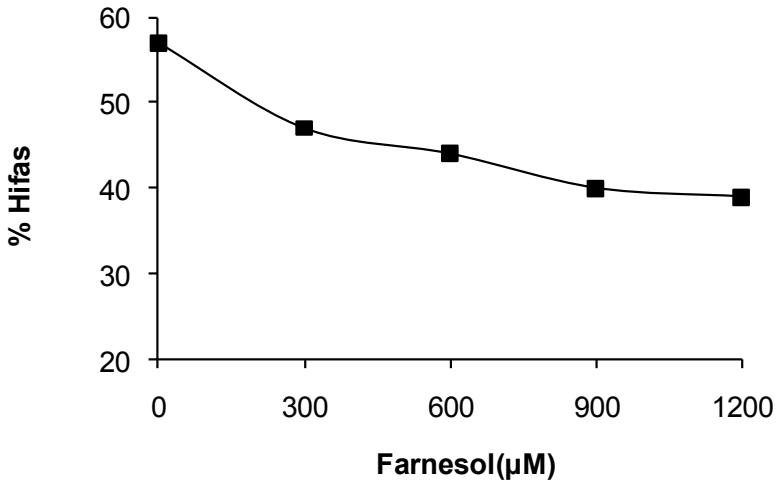

Figura 5.13. Percentagem de hifas formadas (considerando hifa as células com alongamento maior que 2,0) nos cultivos de *Y. lipolytica* sob agitação de 60 rpm em meio YPD* com 10% de soro e com diferentes concentrações de farnesol, após 24h de experimentos.

Em valores de porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol (I), é possível observar, nitidamente, a dependência entre o efeito e concentração de farnesol (Figura 5.14). A concentração de 300 µM foi eficiente na inibição da formação de hifas, chegando a uma porcentagem de inibição (I%) de 17,5%. Com o aumento da concentração de farnesol adicionada, observa-se um aumento proporcional de I. Com 600 µM, foi obtido 22,8% de inibição, com 900 µM, 29,8% e com 1200 µM, 31,6%.

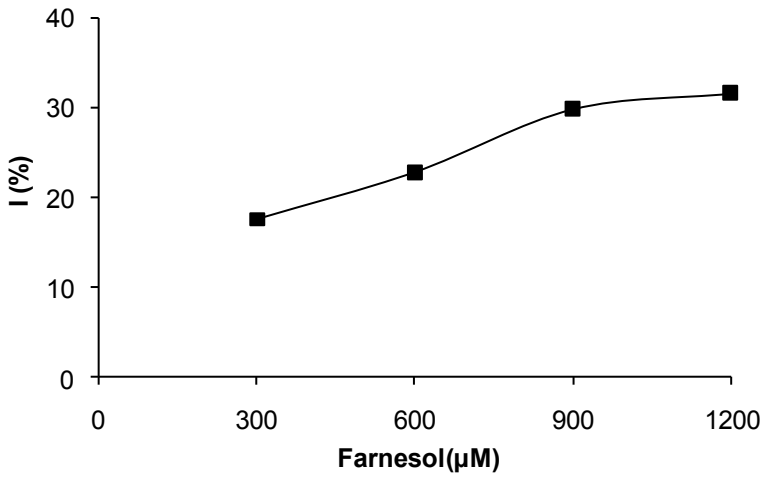

Figura 5.14. Porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol (I) para *Y. lipolytica* nos cultivos sob agitação de 60 rpm em meio YPD* com 10% de soro fetal bovibo e com diferentes concentrações de farnesol.

.

Henriques *et al.* (2006) observaram a morfologia celular de *C. albicans e C. dubliniensis* sob ação de farnesol e mostraram que este composto proporcionou inibição na formação de hifas, mostrando uma certa dose-dependência. Na presença de 150 µM de farnesol, *C. albicans* apresentou uma inibição de 97% e chegou a 100% de inibição com 400 µM. A dose necessária para a inibição de 100% de hifas em *C. dubliniensis* foi de 150 µM. Sato *et al.* (2004) também relataram uma inibição na formação de hifas em *C. albicans* de 100% com uma concentração de 300 µM de farnesol. Com base nos resultados obtidos, podemos observar que *Y. lipolytica* apresentou uma maior resistência ao efeito do farnesol, em comparação com *C. albicans*. Foi necessária uma concentração 4 vezes maior de farnesol para obter em torno de 31,6% de inibição. Segundo Ramage *et al.* (2002), que estudaram o efeito do farnesol em *C. albicans*, as células tratadas com 300 µM de farnesol produziram biofilmes escassos, compostos predominantemente de células leveduriformes e pseudohifas. Biofilmes formados na presença de 3 e 30 µM de farnesol apresentavam arquitetura mais densa, com células ovais, pseudohifas e hifas verdadeiras. Este é um excelente exemplo da dose-dependência da morfologia celular em relação a concentração do farnesol. O controle, livre de farnesol, apresentou biofilme formado exclusivamente por hifas verdadeiras.

Souza Silva (2009) avaliou o efeito do soro fetal bovino sobre a ação do farnesol e observou que, na presença do soro, a concentração letal de farnesol para o fungo *P. brasiliensis*, era muito superior aquela encontrada na ausência de soro. O soro parece proteger o fungo contra os efeitos letais do farnesol. Mosel *et al.* (2005) também observaram que o efeito do farnesol sobre *C. albicans* era afetado drasticamente pela

presença de soro. A quantidade de farnesol necessária para inibir a formação de hifas aumentou de 150 para 250 µM, quando a concentração de soro foi alterada de 10 para 20%. É possível que na ausência de soro fetal bovino, a concentração de farnesol necessária para inibir a formação de hifas em *Y. lipolytica* também seja menor, e esta levedura seria mais susceptível à ação de farnesol.

5.5.2. Efeito de farnesol sobre a morfologia e o crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na presença de N-acetilglicosamina

Com o objetivo de avaliar o efeito do farnesol na presença de um indutor da formação de hifa diferente do soro fetal bovino, foram realizados ensaios para a avaliação do efeito do farnesol utilizando a N-acetilglicosamina como indutor, nas mesmas condições de cultivo, 60 rpm e 24 h. As concentrações de farnesol testadas foram 300 e 600µ M. A determinação da concentração celular e a análise morfologica foram realizados em 0, 15 e 24 h de cultivo. Observa-se na Figura 5.15 que houve a inibição do crescimento celular, na presença de farnesol, em relação ao experimento controle (na presença de N-acetilglicosamina e ausência de farnesol).

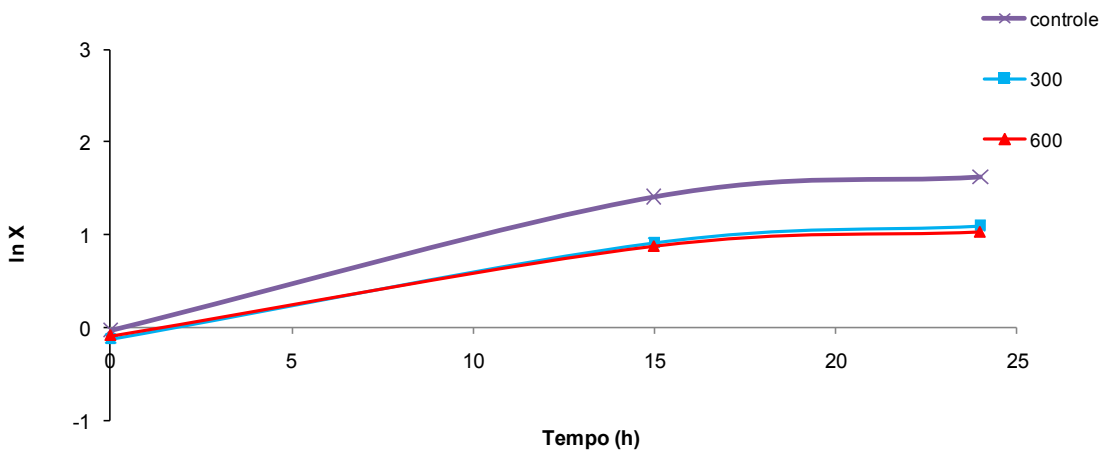

Figura 5.15. Cinética de crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina (experimento controle) e em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina e diferentes concentrações de farnesol, com agitação de 60 rpm.

Na Figura 5.16 é possível detectar o efeito do negativo do farnesol sobre a formação de hifas, destacando que a porcentagem de hifas caiu drasticamente com a adição de 600 µM de farnesol. É possível observar que o efeito dose-dependente foi mantido para N-acetilglicosamina.

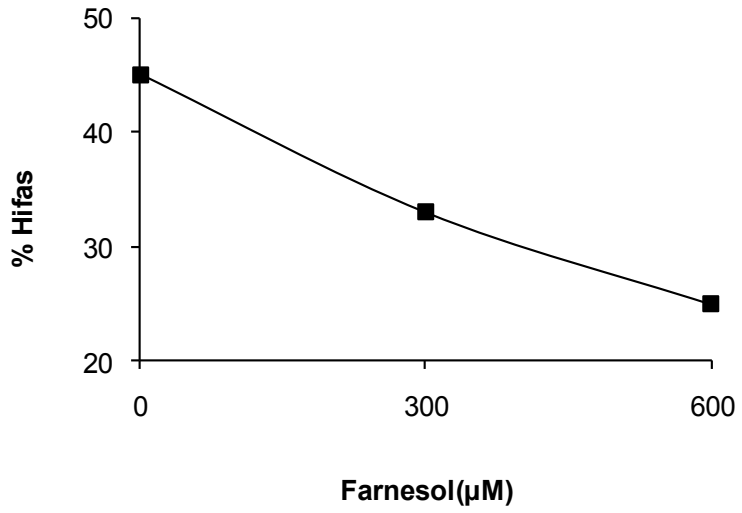

Figura 5.16. Porcentagem de hifas formadas (considerando hifa as células com alongamento maior que 2,0) nos cultivos de *Y. lipolytica* sob agitação de 60 rpm em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina e com diferentes concentrações de farnesol, após 24h de cultivo.

Os resultados de porcentagem de inibição mostram que com a dose de 600 µM o valor de I chegou a 44,4% (Figura 5.17). Comparando com os resultados obtidos com o soro fetal bovino, os cultivos na presença de N-acetilglicosamina, a concentração de farnesol requerida para uma maior inibição da formação de hifas é bem menor. Portanto, com este indutor, o farnesol se mostrou mais eficiente.

É possível que esta grande diferença entre os resultados com soro fetal bovino e com N-acetilglicosamina, seja devido à ação protetora exercida pelo soro sobre a levedura, como mencionado na literatura (MOSEL *et al*., 2005; SOUZA SILVA, 2009).

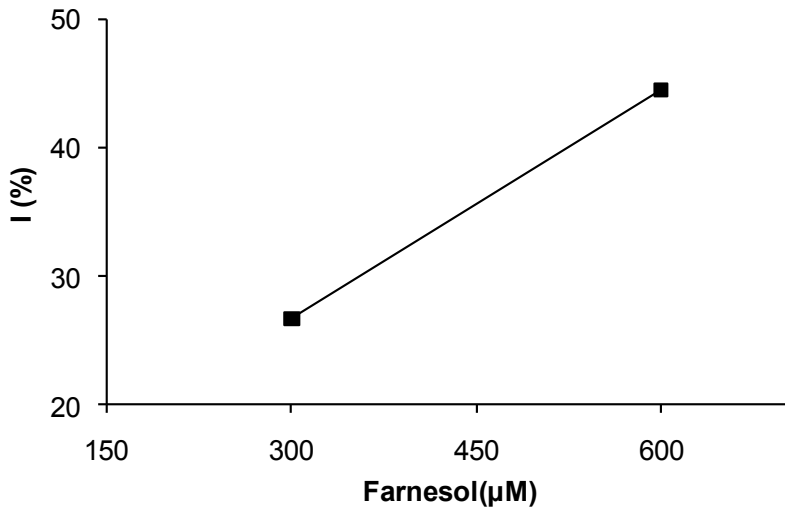

Figura 5.17. Porcentagem de inibição da formação de hifas por farnesol (I) para *Y. lipolytica* nos cultivos sob agitação de 60 rpm em meio YPN com 1% de N-acetilglicosamina e com diferentes concentrações de farnesol

.

5.6. Avaliação da morfologia colonial de *Yarrowia lipolytica*

5.6.1. O efeito da fonte de carbono e de soro fetal bovino sobre a morfologia das colônias de *Yarrowia lipolytica*

Foram avaliadas a utilização de diferentes fontes de carbono (glicose e N-acetilglicosamina) e a ação de soro fetal bovino sobre a morfologia colonial de *Y. lipolytica* em meio sólido. A composição dos meios de cultivo está listada na Tabela 4.4. do capítulo metodologias experimentais. As fotos da morfologia colonial e da morfologia celular foram registradas após o cultivo de *Y. lipolytica* em meio sólido em placas de petri por 48h em estufa a 28°C. Em todos os experimentos controle (sem farnesol) foi adicionado um volume de etanol equivalente ao utilizado para adição de farnesol nos experimentos.

É possível observar na Figura 5.18 que na presença de glicose as colônias apresentam coloração branca, aspecto rugoso e bordas bem definidas. Houve formação de hifas em pequena quantidade após 48 h de cultivo, o que provavelmente deve-se à necessidade das células de buscar os nutrientes no meio sólido. Microscopicamente, observa-se hifas e muitas células ainda na forma oval (Figura 5.19).

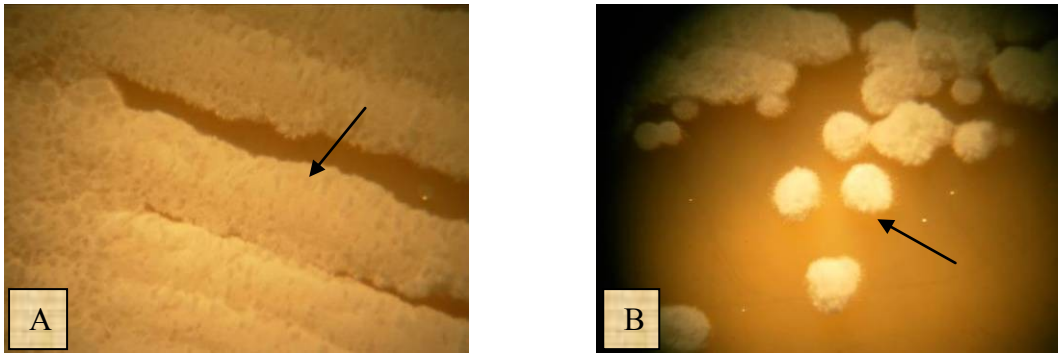

Figura 5.18. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.

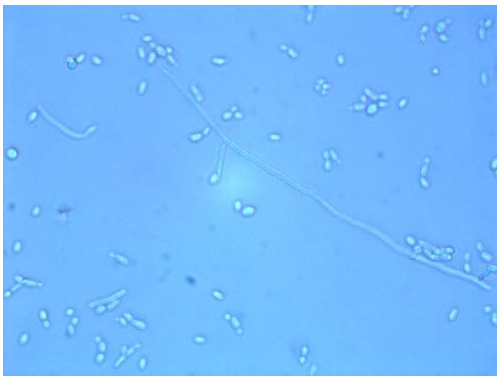

Figura 5.19. Foto de microscopia óptica (aumento total de 400x) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.

Com N-acetilglicosamina, como fonte de carbono, as colônias apresentaram cor branca, aspecto rugoso e, além disso, é possível observar através das fotos da figura 5.20 que as bordas das colônias apresentam estruturas parecidas com cristais. Essas estruturas são as hifas formadas com essa fonte de carbono. Observando a Figura 5.21 é possível notar que o número de células na forma oval é menor que aquele observado na presença de glicose e também apresenta maior número de hifas. Portanto, N-acetilglicosamina induziu a formação de maior quantidade de hifas que a glicose também em meio sólido.

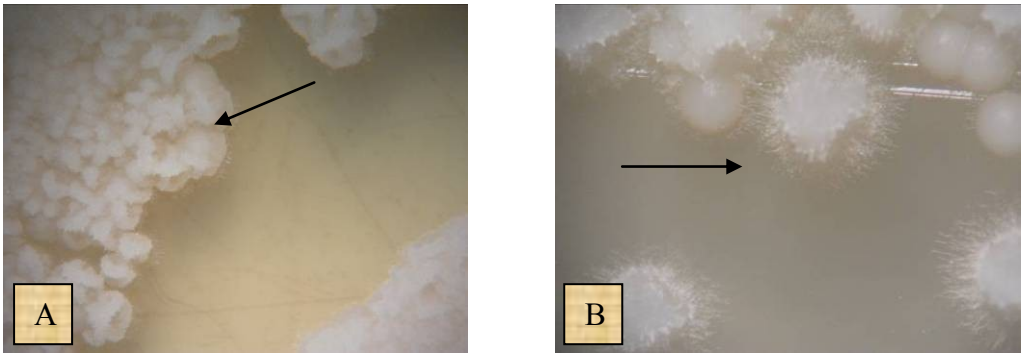

Figura 5.20. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono.

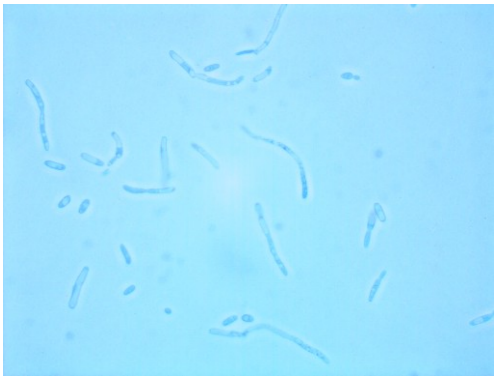

Figura 5.21. Foto de microscopia óptica (aumento de 400x) de *Y. lipolytica* em meio contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono.

Quando soro fetal bovino foi utilizado como indutor da formação de hifas, associado à glicose, as colônias apresentaram-se brancas, mas não apresentam bordas definidas, como é possível notar na Figura 5.22. Nota-se facilmente que houve uma grande formação de hifas aéreas e exibindo o fenótipo que se assemelha a aparência de algodão. Portanto, o efeito do soro fetal bovino na formação de hifas em meio sólido foi bastante significativo. Através da microscopia é possível notar que praticamente todas as células apresentam-se como filamentos (Figura 5.23).

Perez-Campo & Dominguez (2001) observaram que as colônias de *Y. lipolytica* na presença de soro apresentavam crescimento de filamentos invasivos em agar e estas colônias possuíam também o aspecto de algodão.

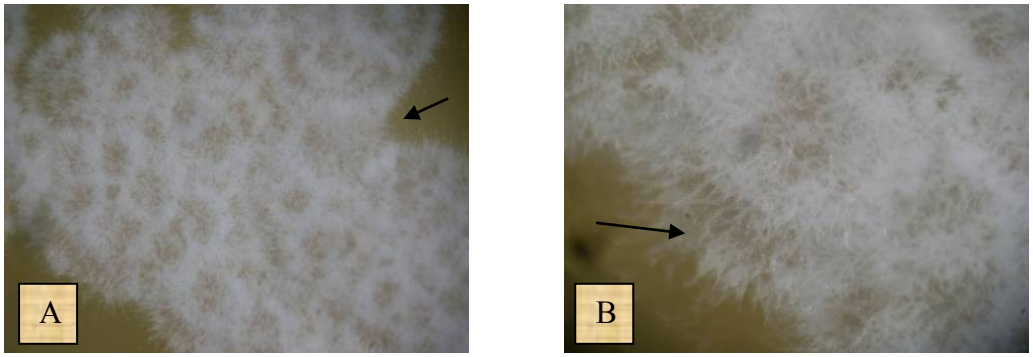

Figura 5.22. Fotos digitais das colônias (A e B) de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino como indutor da formação de hifas.

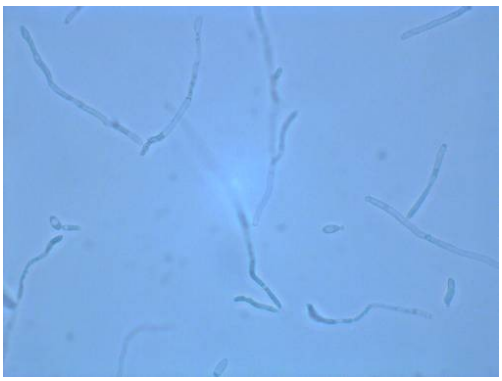

Figura 5.23. Foto de microscopia óptica (aumento de 400x)) de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino como indutor da formação de hifas.

5.6.2. O Efeito de farnesol sobre a morfologia das colônias de *Yarrowia lipolytica.*

Para avaliar os efeitos de farnesol sobre a morfologia das colônias de *Y. lipolytica*, foram utilizados meios de cultivo contendo glicose, N-acetilglicosamina e soro fetal bovino e os meios foram preparados com composição igual aqueles utilizados para os experimentos sem farnesol, acrescentados de 600 µM de farnesol. As fotos foram obtidas após 48 h em estufa a 28°C. De acordo com Mosel *et al*. (2005) as concentrações de farnesol usadas para bloquear a formação de hifas são as mesmas para o meio líquido e o meio sólido. A atividade do farnesol não é influenciada pelo agar.

Foi observado que na presença de farnesol, houve mudança na morfologia das colônias com os três meios de cultivo utilizados. Na presença de glicose as colônias apresentaram-se mais mucóides (Figura 5.24). Com N-acetilglicosamina houve a formação de colônias com bordas apresentando menos formações do tipo cristalina

(Figura 5.25.) do que anteriormente apresentado na Figura 5.20, sem farnesol. Na presença de soro fetal bovino bordas definidas podem ser observadas na Figura 5.26, apesar das colônias ainda apresentarem aspecto de algodão. Microscopicamente foi possível ver que nas três situações houve menor formação de hifas, estas apresentando-se menores e maior número de células ovais (Figura 5.27).

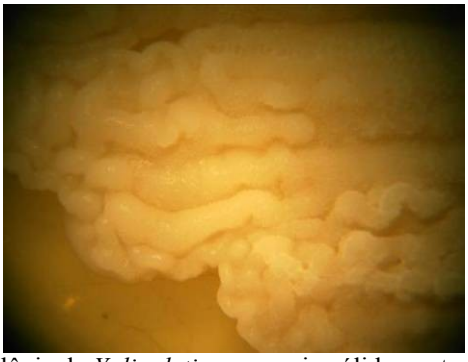

Figura 5.24. Foto digital da colônia de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose, na presença de 600 µM de farnesol.

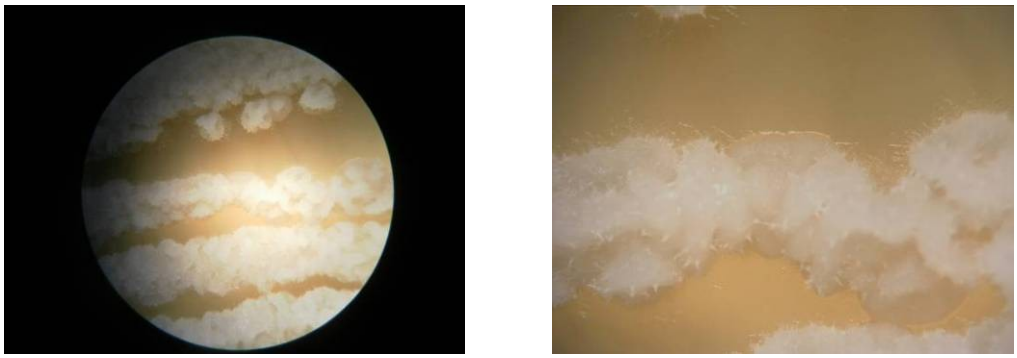

Figura 5.25. Fotos digitais das colônias de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo N-acetilglucosamina, na presença de 600µM de farnesol.

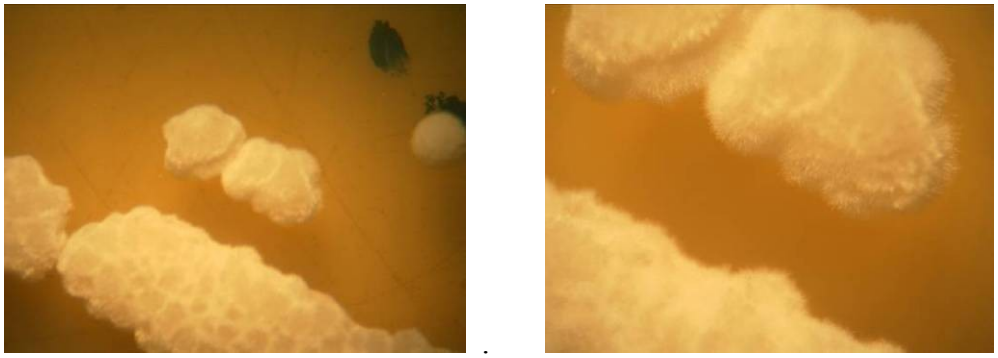

Figura 5.26. Fotos digitais das colônias de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono e soro fetal bovino, na presença de 600µM de farnesol

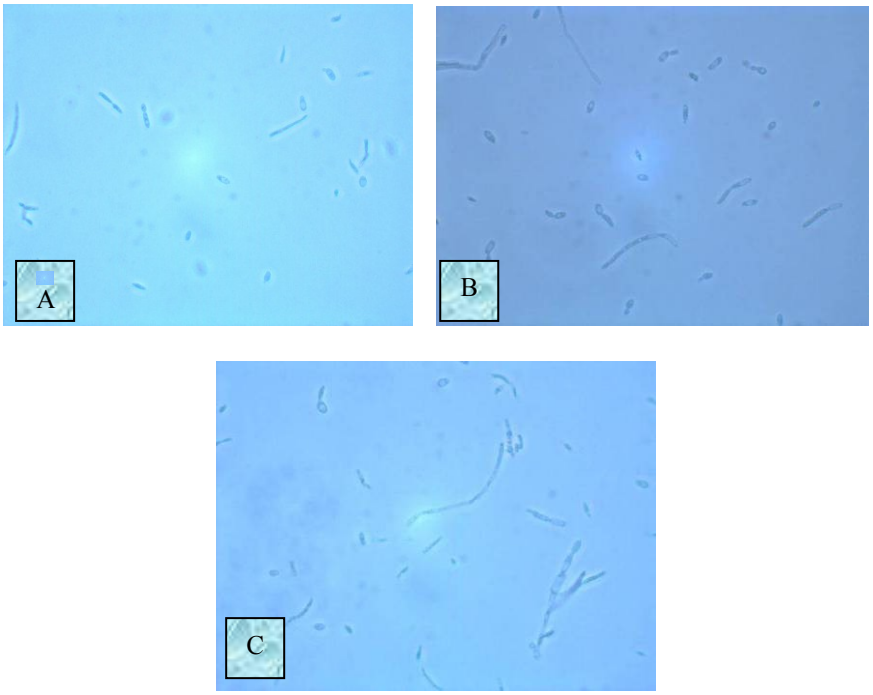

Figura 5.27. Fotos de microscopia óptica (aumento de 400x)) de *Y. lipolytica* em meio sólido contendo glicose (A), N-acetilglucosamina (B) e glicose e soro fetal bovino (C) na presença de 600 µM de farnesol.

Liu *et al.* (2009) observaram o efeito de farnesol sobre a morfologia colonial de *Penicillium expansum.* As concentrações de farnesol estudadas foram 100, 200 e 400 µM. Nos experimentos com 100 e 200 µM houve inibição de 100% da esporulação das colônias. Além disso, foram observadas colônias de tamanhos menores que as obtidas no experimento sem farnesol (controle) e, as colônias tratadas com farnesol apresentavam um aspecto de levedura. No experimento controle as colônias apresentavam-se sem bordas definidas, irregulares. A concentração de 400 µM parece ter limitado a área de crescimento das hifas.

Portanto, a morfologia colonial de *Y. lipolytica* sofre influência da fonte de carbono utilizada, pois esta levedura apresentou diferentes morfologias na presença de glicose e de N- acetilglucosamina, com predomínio de hifas em N-acetilglicosamina. Soro fetal bovino é capaz de induzir a formação de hifas em meio sólido e o farnesol atua de forma inibitória sobre a formação de hifas em *Y. lipolytica* também em meio sólido.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

Na presença de glicose, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 se apresenta predominantemente na forma oval.

N-acetilglicosamina induziu a formação de 45 % de hifas após 15h de cultivo.

A agitação foi um parâmetro estatisticamente significativo na formação de hifas, e teve um efeito negativo sobre essa variável dependente, na faixa de agitação estudada. A agitação de 60 rpm propiciou a maior formação de hifas, na presença de soro fetal bovino.

Soro fetal bovino é o melhor indutor da formação de hifas. Na presença de 10% de soro fetal bovino foram formadas 57% de hifas ao final de 24h de cultivo.

Farnesol apresenta um efeito inibitório sobre o crescimento celular de *Y. lipolytica* nas condições estudadas

Farnesol é capaz de inibir a formação de hifas em *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

A inibição da formação de hifas é dependente da concentração do farnesol utilizada.

A maior concentração de farnesol utilizada (1200 μM) foi a que melhor inibiu a formação de hifas, mas é possível observar efeitos inibitórios a uma concentração de 300 μM.

O farnesol apresentou uma porcentagem de inibição de 31,6% da formação de hifas quando utilizado o soro fetal bovino a 10%, como indutor, utilizando agitação de 60 rpm. Este valor de inibição deve-se ao fato do soro fetal bovino apresentar um efeito protetor para a levedura e, neste caso, é necessária uma concentração maior de farnesol para obter maior efeito inibidor.

Utilizando N-acetilglicosamina como fonte de carbono, uma concentração de 1200 μM de farnesol foi necessária para inibir a formação de hifas em 44,4%.

O efeito inibitório de farnesol sobre a formação de hifas também ocorre em meio sólido.

O resultado de inibição da formação de hifas utilizando farnesol obtido foi satisfatório, o que mostra o potencial desta substância para utilização no controle da morfologia para a sua aplicação na área industrial e/ ou na área médica.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

_ Otimizar as condições de inibição de farnesol sobre a formação de hifas para a obtenção de melhores porcentagens de inibição, para um melhor controle da morfologia de *Y lipolytica,*utilizando o planejamento experimental.

_ Tendo em vista que a inibição obtida em soro fetal bovino foi de 48%, estudar os mecanismos que levam à resistência desta levedura a este sesquiterpeno.

_ Estudar a possibilidade de otimização das culturas em N-acetilglicosamina, com o objetivo de atingir 100% de inibição.

_ Estudar as substâncias produzidas por *Y. lipolytica* (lipase, emulsificante, ácido cítrico, ácido isocítrico), em cada uma das fases morfológicas (célula oval e hifas), com o objetivo de otimizar a produção através do controle da morfologia;

_ Estudar o potencial de aplicação de farnesol como um antisséptico, antibiótico ou adjuvante do tratamento contra fungos patogênicos;

_ Avaliar o potencial de aplicação de farnesol na indústria, uma vez que esta substância pode induzir um tipo de morfologia celular e, consequentemente, controlar a produção de substâncias relacionadas com a morfologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P.F.F. (2003). Emprego de carreador de oxigênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

AMARAL, P. F. F. M. Lehocky, A. M. V. Barros-Timmons, M. H. M. Rocha-Leão, M. A. Z. Coelho, J. A. P. Coutinho. (2006). Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, *Wiley InterScience* , v 23, p 867–877.

ANDRE, R. C. T (2007). Comunicação entre bactérias-estudo preliminar na espécie *Pseudomonas syringae*, Relatório de estágio da licenciaturaem Química, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

ANDREISHCHEVA, E.N., SOARES, M.I.M. & ZVYAGIL'SKAYA, R.A. (1997). Energy metabolism of *Candida (Yarrowia) lipolytica* yeast under nonstress and salinity stress conditions, *Russian J. of Plant Physiol.*, v.44, n.5, p.568-574.

BARTH, G. & GAILLARDIN, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.*, v.19, p.219-237.

BLANCO,J. C. (2009). Functional analysis and localization studies of Phr1 and Gas1 proteins from the fungal pathogen *Candida albicans* and the budding yeast *Sccharomyces cerevisiae*, Tese de Doutorado, Facoltà di Science Matematiche, Fisiche e Naturali, Universitá Degli Study Di Milano, Itália.

BORCHARDT, S. A., ALLAIN, E. J., MICHELS, J. J., STEARNS, G. W., KELLY, R. F., McCOY, W.F.(2001) Reaction of Acylated Homoserine Lactone Bacterial Signaling Molecules with Oxidized Halogen Antimicrobials, *Appl.and Environm.Microbiol.,* v. 67, n. 7, p. 3174–3179.

CERVANTES-CHÁVES, J. A., KRONBERG, F., PASSERON, S., RUIZ-HERRERA, J.(2009). Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*, *Fungal Gen. and Biol.* v.46, p 390–399.

CHEN, D.C., BECKERICH, J.M. GAILLARDIN, C.(2004) One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica, Appl. Microbio. Biotechnol.,* v. 48, p. 232±235.

CHEN, H. & FINK, G. R. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols, *Genes Develop.,* v. 20, p.1150-1161.

CHILLER, T., FARROKHSHAD, K., BRUMMER, E., STEVENS, D.A. (2000). Influence of human sera on the in vitro activity of the echinocandin caspofungin (MK-0991) against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p.3302–3305.

CORZO, G. & REVAH, S. (1999) Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, *Biores. Technol.*, v.70, p.173-180.

CULTLAB. Bula com a composição do soro fetal bovino.Disponível na INTERNET via http://www.cultilab.com.br/paginas/meiotransf Arquivo consultado em 04/03/2011.

DAVIS-HANNA, A., PIISPANEN, A. E., STATEVA, L. I., HOGAN, D. A (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis, *Mol. Microbiol.,* v. 67(1), p.47–62.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., DE MONTIGNY, J., MARCK, C., NEUVE´GLISE, C., TALLA, E., GOFFARD, N., FRANGEUL, L., AIGLE, M., ANTHOUARD, V., BABOUR, A., BARBE, V., BARNAY, S., BLANCHIN, S., BECKERICH, J.M., BEYNE, E., BLEYKASTEN, C., BOISRAME, A., BOYER, J., CATTOLICO, L., CONFANIOLERI, F., DE DARUVAR, A., DESPONS, L., FABRE, E., FAIRHEAD, C., FERRY-DUMAZET, H., GROPPI, A., HANTRAYE, F., HENNEQUIN, R., JAUNIAUX, N., JOYET, P., KACHOURI, R., KERREST, A., KOSZUL, R., LEMAIRE, M., LESUR, I., MA, L., MULLER, H., NICAUD, J.M., NIKOLSKI, M., OZTAS, S., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., PELLENZ, S., POTIER, S., RICHARD, G.F., STRAUB, M.L., SULEAU, A., SWENNEN, D., TEKAIA, F., WESOLOWSKI-LOUVEL, M., WESTHOF, E., WIRTH, B., ZENIOU-MEYER, M., ZIVANOVIC, I., BOLOTIN-FUKUHARA, M., THIERRY, A., BOUCHIER, C., CAUDRON, B., SCARPELLI, C., GAILLARDIN, C., WEISSENBACH, J., WINCKER, P. e SOUCIET, J.L. (2004) Genome evolution in yeasts, *Nature,* v. 430, p. 35–44.

FENG, Q., SUMMERS, E., GUO, B., FINK, G. (1999) Ras signalling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* v.181, p.6339–6346.

FLORES, C-L., RODRÍGUEZ, C., PETIT, T. e GANCEDO, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, n.4, p.507-529.

FREIRE, M. G., DIAS, A. M. A., COELHO, M. A. Z., COUTINHO, J.A.P., MARRUCHO, I. M. (2005). Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis, *J. Col. and Interf. Science*, v. 286, p. 224–232.

FRIEDENTHAL, M., EPSTEIN, A. e PASSERON, S. *et al*., (1974). Effect of potassium cyanide, glucose and anaerobiosis on morphogenesis of *Mucor rouxii*, *J. Gen. Microbiol*., v.82, p.15.

FUQUA, W. C., WINANS, S. C., GREENBERG**,** E. P. **(**1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol*. V.176, p.269–275.

FUQUA, C., PARSEK, M.R. & GREENBERG, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserinelactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet*. v.35, p.439–468.

GANCEDO, J.M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cereviseae*, *FEMS Microbiol. Rev.*, v.25, n.1, p.107-123.

GILBERT, P.; MAIRA-LITRAN, T.; MCBAIN, A. J. (2002) The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol* , v. 46, p. 203-256.

GIMENO, C.J., LJUNGDAHL, P.O., STYLES, C.A. e FINK, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS, *Cell*, v. 68, p.1077-1090.

GU EVARA-OLVERA, L., CALVO-MENDEZ, C., RUIZ-HERRERA, J. (1993). The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Gen. Microbiol.*, v.193, p.485-493.

HAEGLER, A.N. & MENDONÇA-HAEGLER, L.C. (1981). Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, *Appl. Environ. Microbiol*., v.41, n.1, p.173-178

HASTINGS , J. W. & GREENBERG, E. P. (1999). Quorum Sensing: the Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria, *J. of Bacteriol.,* p. 2667–2668.

HENRIQUES ,M., MARTINS ,M., AZEREDO , J., OLIVEIRA, R. (2006). Effect of farnesol on Candida dubliniensis morphogenesis. *Let. in Appl. Microbiol.*, v.44, p.199–205.

HERRERO, A.B., LÓPEZ, M.C., FERNÁNDEZ-LAGO, L. (1999) *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analyzing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. *Microbiol.*, v.145, p.2727-2737.

RUIZ-HERRERA, J. & SENTANDREU, R.(2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, *Arch Microbiol*, v. 178, p.477–483.

HORNBY, J. M., JENSEN, E. C., LISEC, A. D., TASTO, J. J., JAHNKE, B., SHOEMAKER, R., DUSSAULT, P., NICKERSON, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* v.67, p.2982–2992.

HORNBY, J. M., KEBAARA, B. W., NICKERSON, K. W. (2003). Farnesol biosynthesis in Candida albicans: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antim. Ag. Chemother.*, v.47, p.2366–2369.

HUBE, B. (2000) Extracellular Proteases of Human Pathogenic Fungi C*ontrib.Microbiol*, Basel, Karger, v. 5, p. 126-137.

HURTADO, C.A.R. & RACHUBINSKI, R.A.(1999) MHY1 encodes a C2H2-type zinc finger protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica. Journal of Bacteriology*, v.181, n.10, p.3051-3057.

HURTADO, C.A.R, BECKERICH, J.M., GAILLARDIN, C. *et al.*(2000) A Rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J.of Bacteriol.*, v.182, n.9, p.2376-2386.

ISMAIL, S.A.S., DEAK, T., ABDEL-RAHMAN, H.A., YASSIEN, M.A.M. e BEUCHAT, L.R. (2001). Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken**,** *Int. J. Food Microbiol.,* v.64 (1-2), p.13-19.

JIMÉNEZ-BREMONT, J.F., RUIZ-HERRERA, J. e DOMINGUEZ, A. (2001). Disruption of gene YlODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Research*, v.1, p.195-204.

KAWASSE, F.M. (2001). Interação lipase-glicogênio e dimorfismo celular sob condições de estresse térmico e oxidativo em *Yarrowia lipolytica*, Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

KAWASSE, F.M, AMARAL, P.F., ROCHA-LEÃO, M.H.M., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. e COELHO, M.A.Z. (2003). Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing, *Biop. Biosyst. Eng*., v.25, p.371-375.

KIM, J., CHEON, A.C., PARK, S. (2000) Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbio. Lett.*, v.190, n.1, p.9-12.

KIM, S., KIM, E., SHIN, D.S., KANG, H, OH, K.B. (2002) Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism. *Bioorg Med Chem Lett,* v.12, p.895–898.

KUGLER, S., SEBGHATI, T. S., EISSENBERG, L. G., GOLDMAN, W. E. (2000). Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*, *Proc Natl Acad Sci USA* v.97, n. 16, p. 8794-8798.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F. (1998) *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Intern. Microbiol*, v.1, p. 95-106.

MOSEL, D.D., DUMITRU, R., HORNBY, J.M., ATKIN, A.L., NICKERSON, K.W. (2005) Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol.*v.71 p.4938–4940.

MULLER, S.; SANDAL, T.; KAMP-HANSEN, P.; DALBOGE, H. (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorph*a, *Kluyveromyces lacti*s, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytic*a Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytic*a, *Yeast,* v.14, p. 1267-1283.

NAVARATHNA, D. H. M. L. P., HORNBY, J. M., KRISHNAN, N., PARKHURST, A.,DUHAMEL,G.E. & NICKERSON, K.W.(2007) Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a *DPP3* knockout mutant of *Candida albicans. Infect. Immun,* v.75, n.4, p.1609-1618.

NEALSON, K. H., PLATT,T., HASTINGS, J.W.(1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol*.v.104, p.313–322.

NELSON, N.(1944) A photometric adaptation of Somogyi method for the determination glucose. *J. Biol. Chem.*, v.153, p.357.

NICAUD, J-M., FABRE, E. e GAILLARDIN, C. (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker, *Curr. Genet.*, v.16, p.253-260;

NICAUD, J-M., MADZAK, C., BROEK, P.V.D, GYSLER, C., DUBOC, P.,NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIN, C. (2002). Protein expression and secretion in theyeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.*, v.2, n.3, p.371-379.

NOVOTNY, C., DOLEZALOVA, L. & LIEBLOVA, J.(1994) Dimorphic growth and lipase production in lipolytic yeasts. *Fol. Microbiol.*, v.39, n.1, p.71-73.

OH, K. B., MIYAZAWA, H., NAITO, T., MATSUOKA, H.(2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.98, p.4664–4668.

O'SHEA, D. G. & WALSH, P.K. (2000) The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* NRRLy2415:a study incorporating image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol,*v.53, p.316±322.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. e SANT'ANNA, G.L.(1997). A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics, *Appl. Biochem. Biotechnol*., v.63-65, p.73-85.

PÉREZ-CAMPOS, F. M. & DOMINGUES, A. (2001) Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*, *Cur. Microbiol.,* v. 43, p. 429–433.

PORTELA, M. B. (2006) Estudo de Proteínas Funcionais de *Candida Spp*. Isoladas da Cavidade Bucal de Crianças Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil.

RAMAGE, G., S. P. SAVILLE, B. L. WICKES, J. L. LOPEZ-RIBOT (2002) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* v.68, p.5459–5463.

RUIZ-HERRERA, J. & SENTANDREU, S., (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, *Arch Microbiol* ,v.178, p.477–483.

SATO, T., WATANABE,T., MIKAMI,T.,MATSUMOTO (2004), T. Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade , *Biol. Pharm. Bull.*v.27(5), p. 751—752.

SEMIGHINI, C.P., HORNBY, J.M., DUMITRU, R., NICKERSON, K.W. & HARRIS, S.D. (2006) Farnesol-induced apoptosis in Aspergillus nidulans reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol* v.59, p. 753–764.

SEMIGHINI, C.P., MURRAY, N.,HARRIS, S.D. (2008) Inhibition of Fusarium graminearum growth and development by farnesol. *Microbiol let.*, v.279, p.256-264.

SHCHEPIN,R., HORNBY, J. M., BURGER,E., NIESSEN, T., DUSSAULT, P., NICKERSON, K. W. (2003) Quorum Sensing in *Candida albicans*: Probing farnesol's Mode of Action with 40 Natural and Synthetic Farnesol Analogs *Chem. & Biol.*, v.10, p.743–750.

SHINER, E. K., RUMBAUGH, K. P., WILLIAMS, S.C. (2005) Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones, *FEMS Microbiol. Rev.,* v. 29, p.935–947

SILVA, M.R.O. (2004) Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

SOUZA SILVA, C. M.(2009) Efeitos do Farnesol, uma molécula *Quorum Sensing* de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

SZABO, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration, *Folia Microbiol.* v.44, n.1, pp.19-24.

SZABO, R. (2001a) Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Gen. Genom.*, v.265, n.1, p.172- 179.

SZABO, R. (2001b) *Genetic analysis of cell dimorphism in Yarrowia lipolytica*. Disponível na INTERNET via www.url:http://kovaclab.czweb.org/rsproj.htm. Arquivo consultado em 28/01/2011.

SZABO, R. & ŠTOFANÍKOVÁ, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formaton and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Let.*, v.206, p.45-50.

TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. e OKUMURA, S. (1969). Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts, *Agr. Biol. Chem.*, v.33, p.929-938.

WATANABE, N., OTA, Y., MINODA, Y. & YAMADA, K. (1977). Isolation and identification of alkaline lipase producing microrganisms; cultural conditions and some properties of crude enzyme, *Agr. Biol. Chem.*, v.41, p.1353-1358.

WESTWATER,C., BALISH, E. & SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-Conditioned Medium Protects Yeast Cells from Oxidative Stress: a Possible Link between Quorum Sensing
and Oxidative Stress Resistance, *Euk. Cell*, v. 4, n. 10, p. 1654–1661 .

ZINJARDE,S.S., PANT, A. & DESHPANDE, M. V. (1998) Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water, *Mycol. Res.*, v.102 (5), p.553±558.