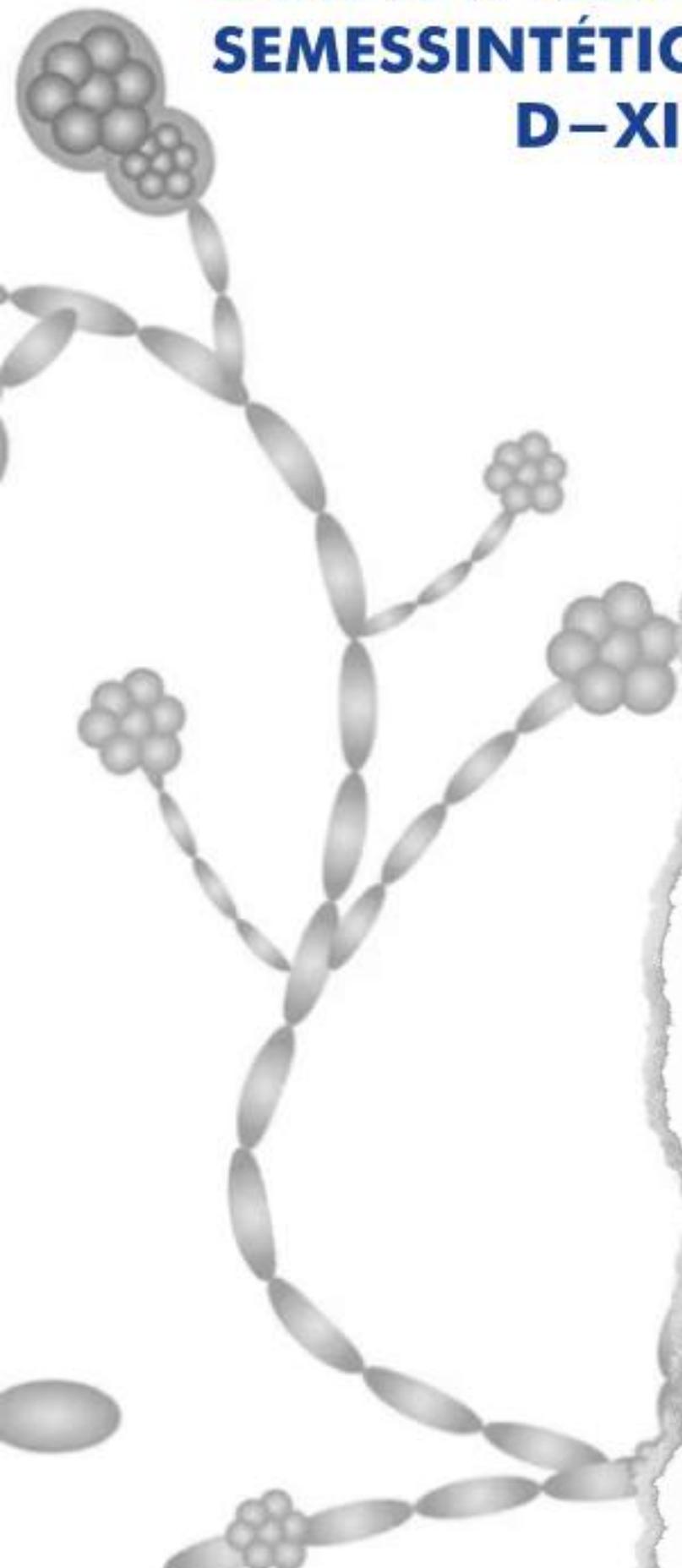


AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CANDIDA ALBICANS EM MEIO SEMESSINTÉTICO CONTENDO D-XILOSE



Autores

Laís Lima Ribeiro

Graduação em Farmácia pelo Centro Universitário Teresa D'Ávila – UNIFATEA – E-mail: secretaria.geral@unifatea.edu.br

Bruno Guedes Fonseca

Doutorado em Ciências - Biotecnologia Industrial pela Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo – USP e docente no Centro Universitário Teresa D'Ávila – UNIFATEA.
E-mail: b.guedes.f@gmail.com

Resumo

Este trabalho tem como princípio avaliar a capacidade da levedura *Cândida albicans* em metabolizar xilose. Com esse objetivo, foi realizado testes com variabilidade de temperatura de incubação e pH, utilizando-se da técnica visual e comparativa para obter os resultados. Neste estudo pode-se constatar o crescimento da *Cândida albicans* em meio enriquecido com xilose, nos diferentes pHs de forma diferenciada e como a alteração de temperatura foi significativa para mesma. Os resultados obtidos foram de grande importância pois pode-se constatar a melhor condição de crescimento para esse micro-organismo.

Palavras-chave: Biomassa Vegetal. Hidrolisado Hemicelulósico. Xilitol. Xilose. *Cândida albicans*.

EVALUATION OF CANDIDA ALBICANS GROWTH IN SEMES-SYNTHETIC MEDIUM CONTAINING D-XYLOSE

Abstract

This work has as principle to evaluate the capacity of the yeast Candida albicans to metabolize xylose. For this purpose, tests were performed with variability of incubation temperature and pH, using the visual and comparative technique to obtain the results. In this study we can see the growth of Candida albicans in a medium enriched with xylose, at different pHs in a different way and how the temperature change was significant for it. The results obtained were of great importance because it is possible to verify the best growth condition for this microorganism.

Keywords: Vegetable Biomass. Hemicellulosic Hydrolyzate. Xylitol. Xylose. Candida albicans.

I. INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas e agroindustriais, denominados de biomassa vegetal lignocelulósica, têm sido largamente empregados como fonte de matéria-prima para a geração de produtos de alto valor agregado, como os biocombustíveis e produtos de interesse farmacêutico e alimentar.

Tal uso é intensificado pelo fato destas matérias-primas serem ricas em diversos açúcares fermentescíveis, que por vias biotecnológicas pode levar a diferentes produtos (TAVARES e SANTOS, 2013; SOUZA et al., 2015).

A parede vegetal da biomassa lignocelulósica é constituída por dois polímeros açucarados, a celulose e hemicelulose, um polímero fenólico, a lignina, cujo teor irá variar de acordo o material (FARINAS, 2011).

Dentre os componentes estruturais da biomassa lignocelulósica que tem recebido destaque é a hemicelulose, um polissacarídeo de cadeia ramificada rico em D-xilose (SHIMIZU, 2018; KIIPER, 2009).

A D-xilose é um monossacarídeo do tipo aldopentose, sendo o segundo açúcar mais abundante na natureza (XAVIER, 2016).

É sabido que são poucos os micro-organismos capazes de fermentar pentosanas, como, por exemplo, a D-xilose. Dentro os que apresentam essa capacidade, utilizam as vias pentoses-fosfato e Embden-Meyerhof-Parnas (via glicolítica) (ROSSI, 2009).

Essa metabolização circunda uma série de fatores como, enzimas, cofatores enzimáticos, substratos, parâmetros químicos e biológicos. A via metabólica da pentose por leveduras e fungos aeróbicos utiliza-se de três enzimas, a xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulose quinase (XK).

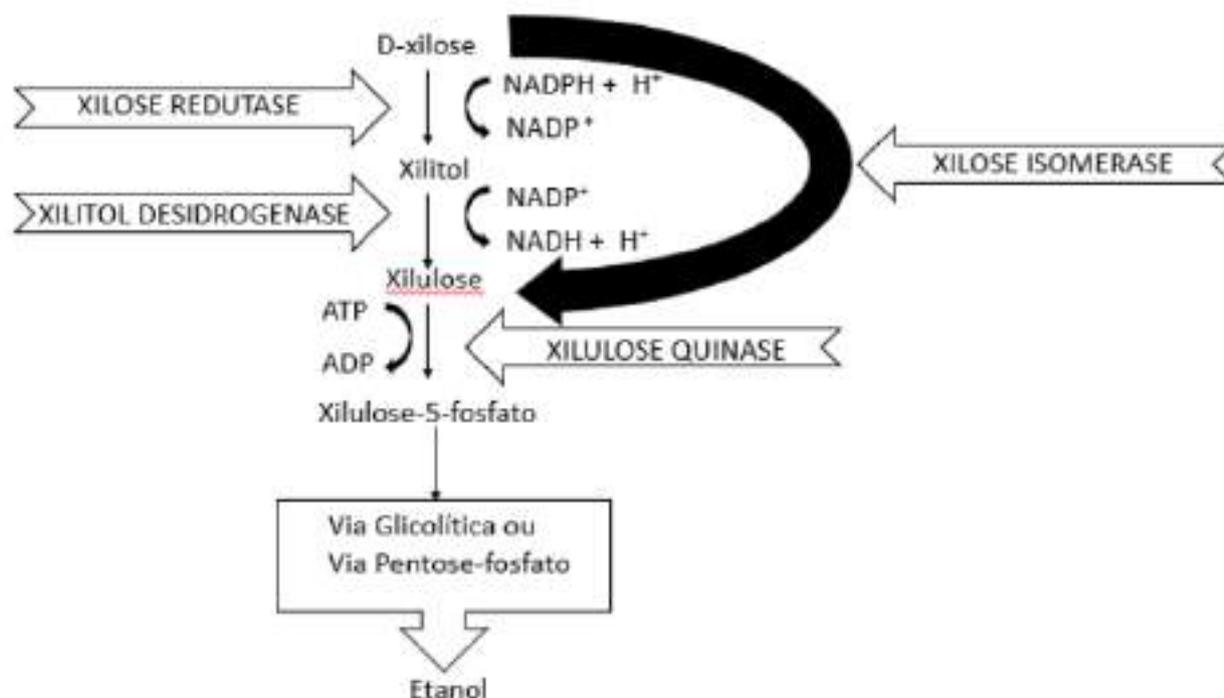
Todo o processo inicia-se com o transporte pela membrana plasmática da D-xilose, em seguida, este açúcar é reduzido pela XR, sendo dependente de NADH ou NADPH.

Essa enzima apresenta o status de componente mais importante da via metabólica, porém o metabolismo envolve outras reações. O xilitol resultante da redução de D-xilose pela xilose redutase, passa por um processo de oxidação a transformando em xilulose pela enzima XDH, que se utiliza do cofator NAD-

Essas duas etapas são limitantes no metabolismo pois submetem a um balanço de cofatores e durante as reações disponibiliza oxigênio.

No caso de bactérias e fungos anaeróbicos não existem os processos de redução e oxidação, a D-xilose é convertida diretamente em xilulose pela xilose isomerase e este produto é fosforilado a xilulose-5-fosfato pela XK, que poderá seguir duas vias, a via glicolítica ou a via pentose fosfato, onde ocorre a produção de etanol (SOUZA, 2019).

Figura 1: Metabolismo de levedura fermentadora de xilose em xilitol.



Fonte: Modificado de SOUZA (2019).

Um dos possíveis produtos do metabolismo fermentativo da D-xilose é o xilitol, um álcool de 5 carbonos, que se apresenta como um pó branco cristalino, elevada estabilidade química e microbiológica (PÉREZ, 2019).

Sendo um carboidrato natural que adoça de forma semelhante a sacarose, o xilitol possui propriedades anticariogênicas e não depende da insulina para ser metabolizada (TAMANINI et al, 2004). Este composto é muito utilizado na área alimentícia, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústrias de resinas sintéticas e na síntese de muitos outros produtos químicos (VAZ JR. et al., 2017).

A síntese química do xilitol se dá a partir da redução da xilose extraída de fontes naturais, como frutas. No entanto, esse processo apresenta a desvantagem de ser dispendioso, baixa disponibilidade de substrato e alto custo de purificação do xilitol (LOURENÇO et al. 2014).

Atualmente, a busca por processos biotecnológicos de produção de xilitol tem recebido destaque, principalmente em relação ao baixo custo de processo. A fermentação da D-xilose, extraída a partir de diferentes fontes de matéria-prima

tem a vantagem de não exigir um licor açucarado com elevado nível de pureza, além de empregar condições reacionais mais brandas (TAMANINI; HAULY, 2004; LOURENÇO et al. 2014).

As leveduras pertencentes ao gênero *Cândida* são micro-organismos eucariotes com parede celular composta de quitina e membrana plasmática fosfolipídica. Por ter sua parede mais rígida, não conseguem realizar fagocitose, logo faz nutrição de fontes de carbono absorvido do ambiente. A espécie mais encontrada deste gênero é a *Cândida albicans* que é uma levedura facilmente encontrada como agentes etiológicos em infecções humanas, habitando o trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele e mucosa do trato respiratório (SANTANA et al., 2013; VIEIRA; SANTOS, 2016).

Além disso, a espécie de *Cândida albicans* pode ser encontrada na natureza, ocupando vários habitats ao contrário de outras desse gênero que se encontram limitadas. Como características morfológicas, apresentam-se em forma de colônias úmidas, cremosas de odor específico, aspecto liso a rugoso e coloração branco-amarelado, com formação de tubo-germinativo (SANTANA et al., 2013).

Leveduras pertencentes a este grupo são conhecidas serem rápidas e eficientes na assimilação de pentoses, sugerindo assim, uma via ativa de utilização de D-xilose (HONG; WU; ZHAO, 2010).

2 METODOLOGIA

No presente estudo foi utilizada a levedura *Cândida albicans* ATCC 10231 como modelo microbiano de crescimento em meio a base de D-xilose. Para sua ativação, a levedura foi inoculada em caldo BHI por 48 horas a 25°C.

A capacidade de crescimento da levedura *Cândida albicans* em meio suplementado com D-xilose, como fonte de carbono e energia, foi avaliada a partir de placas de petri. Inicialmente, foram preparadas soluções concentradas dos componentes a seguir, de forma a compor o meio de cultura: D-xilose (30 g/L), ureia (2,0 g/L), MgSO₄.7.H₂O (1,1 g/L), KH₂PO₄ (18 g/L) e ágar Sabouraud (65 g/L).

Todas as soluções foram autoclavadas separadamente, a 111°C, 0,5 atm por 15 minutos, e misturadas ao final de forma a atingir a concentração desejada. Para esse estudo, os meios de crescimento tiveram seus pHs ajustados para 4,0 e 5,5. Para isso, empregaram-se soluções estéreis de H₂SO₄ 2,5 mol/L e NaOH 0,1 mol/L.

Após resfriamento do meio até alcançar 50°C, foi transferido um volume de 12 mL do meio liquefeito para placas de petri esterilizadas de 25 x 150 mm, de forma a atingir uma espessura de 4 mm. Com uma pipeta esterilizada, 0,1 mL do

inóculo foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, que permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica em diferentes temperaturas (25°C, 35°C e 45°C) por um período de 168 horas.

O crescimento microbiano foi acompanhado em intervalos de 24 horas e analisado por comparação visual.

É importante dizer que foram realizados ensaios controle positivo, onde foram empregados meios contendo apenas o ágar Sabouraud inoculados e controle branco, onde o meio não foi inoculado. Além disso, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente trabalho refere-se a uma pesquisa qualitativa experimental, com o objetivo principal de avaliar a capacidade da levedura *Candida albicans* em metabolizar D-xilose. Os resultados mostraram que a temperatura de incubação afetou mais fortemente o crescimento celular que o pH inicial do meio, conforme apresentado na Tabela 1.

Ressalta-se que todo o estudo foi realizado utilizando métodos de análise comparativa visual, sendo uma análise qualitativa, foi definido para melhor compreensão a utilização de cores, sendo adotado o vermelho para indicar que não houve crescimento celular, o amarelo indicando que um ligeiro crescimento e, por fim, o verde que indica que o crescimento se estabilizou.

Verifica-se que em pH 4,0, a levedura começou a apresentar crescimento já nas primeiras 24 h, independente da temperatura, com exceção do ensaio realizado a 25°C, que apresentou crescimento a partir de 48 h de ensaio. Ainda em relação ao pH 4,0, observa-se na Tabela 1 que o melhor resultado no crescimento celular se deu quando incubada a levedura a 45°C, com um crescimento estabilizado a partir de 120 h.

E, nesse caso, o perfil semelhante foi observado no meio com pH inicial de 5,5. Sendo que, diferentemente do observado para o pH 4,0, o crescimento da levedura se estabilizou a partir de 120 h, tanto para os ensaios conduzidos a 35°C quanto a 45°C.

Tais resultados mostram que a temperatura de incubação foi mais significativa para o crescimento celular que o pH inicial do meio. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto mais elevada a temperatura de incubação, mais rapidamente a levedura consome os nutrientes e quanto mais baixa a temperatura, mais devagar é este consumo (BRAGA, 2006).

Em paralelo, avaliou-se o crescimento da mesma no ágar Sabouraud que foi classificado como controle positivo. Este ensaio foi realizado com o objetivo de comparar o crescimento apenas no ágar e no meio suplementado com D-xilose.

Nesse estudo, pôde-se observar que a adição de D-xilose como fonte de carbono e energia mudou o comportamento do crescimento de *Candida albicans*, pois foi demonstrado que no meio apenas contendo o ágar houve uma inibição a 45°C, por ser uma temperatura fora do ideal para esse microrganismo, que apresenta seu crescimento ideal a uma temperatura variando de 20° a 38°C (SANTANA et al, 2013), já nas outras temperaturas não houve diferença em relação a este controle.

Tabela 1 – Variação do crescimento da levedura *Candida albicans* ATCC 10231 incubada em diferentes condições de temperatura e pH

Tempo (h)	Condições Experimentais											
	pH 4,0			pH 5,5			Controle Positivo			Controle Branco		
	25°	35°	45°	25°	35°	45°	25°	35°	45°	25°	35°	45°
0	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
24	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
72	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
96	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
120	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
144	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
168	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

(■) sem crescimento celular, (■) ligeiro crescimento celular, (■) crescimento celular estabilizado.

4 METODOLOGIA

É importante dizer que o ágar Sabouraud é composto por peptona de caseína (5,0 g/L), peptona de carne (5,0 g/L), D-glicose (40 g/L) e ágar-ágar (15 g/L). Este meio já apresenta uma fonte de carbono, a D-glicose, porém quando enriquecido com D-xilose, apresentou resultados mais satisfatórios de crescimento, o que indica que a levedura *Candida albicans* ATCC 10231 também metaboliza esse tipo de açúcar, acredita-se que como resultou em um crescimento bem diferenciado nos testes com ágar e o enriquecido esse microrganismos consegue crescer em um meio contendo apenas xilose como única fonte de carbono (KHAN et al, 2011).

O que se pode confirmar que essa levedura metaboliza não apenas glicose como também alguns açucares pentoses como a xilose (PEREIRA, AGUAR e

GERRE, 2020). Para realizar tal metabolização essa espécie tem que apresentar as enzimas XR e XDH que são responsáveis por reduzir a xilose e oxidar o xilitol respectivamente, onde foi constatado a presença do gene XYL1 que codifica a XR e XYL2 que é pela XDH, por este motivo a mesma consegue metabolizar esse tipo de açúcar, esses genes que codificam as enzimas podem variar a cada microrganismo (MORAIS et al, 2017; HARCUS et al, 2013).

A relação observada em todo o estudo é que baixas temperaturas deixam mais lentos o metabolismo do microrganismo (ZANGIROLAMI, 1992). Uma avaliação geral pode-se confirmar que a *Cândida albicans* é favorecida por um pH ácido tendo uma faixa ideal de pH igual a 2,5 até 7,5 (SANTANA et al., 2013).

Esta levedura apresenta um mecanismo de adaptação pois apresentam peculiaridades de pH, níveis de O₂, temperatura e disponibilidade de nutrientes. A *Cândida albicans* apresenta três formas de crescimento, hifas, pseudo-hifas e leveduras, cada uma delas apresentam diferentes condições para crescimento, a levedura tem o crescimento favorecido a 30°C em pH ácido já a hifas apresenta em 37°C e pH neutro por último a pseudo-hifas tem as melhores condições a 35°C e pH 5,5 (CARDOSO, 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados, pode-se concluir que a temperatura de incubação afetou mais fortemente o crescimento da levedura *Cândida albicans* do que o pH inicial do meio, quando incubada a levedura em meio suplementado com D-xilose como fonte de carbono e energia.

Além disso, foi verificado que no meio contendo apenas o ágar Sabouraud o crescimento da levedura foi menor, independente da temperatura de incubação empregada, o que confirma que a levedura é capaz de metabolizar a pentose.

Tais resultados mostram a capacidade desta levedura em consumir D-xilose, porém novos ensaios empregando meio líquido contendo apenas a pentose como fonte de carbono e energia se fazem necessários, de forma a verificar o produto formado.

AGRADECIMENTOS

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado. Ao CNPq pelo financiamento da bolsa para a realização da pesquisa (Processo nº 117296/2019-8).

REFERÊNCIAS

BRAGA V.S. A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CARDOSO T.S. Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans*. (Dissertação de Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

FARINAS C.S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. Embrapa Instrumentação, Documentos, ISSN: 1518-7179; 54, 2011.

HARCUS D., DIGNARD D., LÉPINE G., ASKEW C., RAYMOND M., WHITEWAY M. e WU C. Comparative xylose metabolism among the Ascomycetes *C. albicans*, *S. stipites* and *S. cerevisiae*. Plos one, volume 8, páginas 1 – 10, 2013.

HONG S., WU J., ZHAO H. Cloning, overexpression, purification, and site-directed mutagenesis of xylitol-2-dehydrogenase from *Candida albicans*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, volume 62, páginas 40 – 45, 2010.

KHAN Z., AHMAD S., CHANDY R. e JOSEPH L. A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, volume 72, páginas 285 – 287, 2011.

KIIPPERP.G. Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

LOURENÇO M.V., DINI-ANDREOTE F., AGUILAR-VILDOSO C.I. e BASSO L.C. Biotechnological potential of *Candida* spp. for the bioconversion of D-xylose to xylitol. African Journal of Microbiology Research, volume 8, páginas 2030 – 3026, 2014.

MORAIS C.G., BATISTA T.M., KOMINEK J., BORELLI B.M., FURTADO C., MOREIRA R.G., FRANCO G.R., ROSA L.H., FONSECA C., HITTINGER C.R., LACHANCE M. e ROSA, C.A. *Spathasporaboniae* ao. Nov, a D-xylose-fermenting species in the *Candida albicans* / *Lodderomyces* clade. International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, volume 68, páginas 3798 – 3805, 2017.

PEREIRA T.N., AGUIAR A.A. e GERRE E.B. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir da casca de mandioca (*Manihot esculenta*). Journal of Biotechnology and Biodiversity, Volume 8, página 187 – 191, 2020.

PÉREZ A.F.H. Produção biotecnológica de xilitol a partir da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar com aproveitamento do melaço: otimização das condições de cultivo e engenharia da via metabólica. (Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

ROSSIR.A. Isolamento e seleção de leveduras nativas dos biomas brasileiros com habilidade em fermentar a etanol a açúcares não convencionais. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SANTANA D.P., RIBEIRO E.L., MENEZES A.C.S. e NAVES P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Revista Ciência Médica e Biológicas, Volume 12, páginas 229 - 233, 2013.

SHIMIZU F.L. Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2018.

SOUZA R.M. Produção de xilitol por linhagens de leveduras do gênero *Cyberlindnera*. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SOUZA V.H.A., SANTOS L.T., PAGEL U.R., SCARPATI C.B.L. e CAMPOS A.F. Aspectos sustentáveis da biomassa como recurso energético. Revista Augustus, Volume 20, páginas 105 - 123, 2015.

TAMANINI C., CANETTIERI E.V., FELIPE M.G.A., HAULY C.O.M. e BERNARDI F.P. Avaliação da casca de aveia para a produção biotecnológica de xilitol. Acta Scientiarum, Volume 26, páginas 117 - 125, 2004.

TAVARES, S. R. L. e SANTOS, T. E. Uso de diferentes fontes de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis sólidos. HOLOS, Volume 5, páginas 19 - 27, 2013.

VAZ JR. S., DONATE P.M., SILVA W.R., KIKUCHI D.K. e SOUZA V.S. Hidrogenação seletiva de D-xilose a xilitol utilizando catalisadores de paládio suportados em compósito nanoestruturado de carbono. Embrapa Agroenergia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 2177-0395, 4, 2017.

VIEIRA A.J.H. e SANTOS J.I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. RBAC, Volume 49, páginas 235 - 239, 2016.

XAVIER F.D. Produção biotecnológica de xilitol a partir da fração hemicelulósica da fibra de sisal. (Dissertação de Mestra-

do em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

ZANGIROLAMI T.C. Otimização da produção de xilitol a partir de xilose por Candida parapsilosis através de análise por superfície de resposta. (Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.