



DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIA E FUNGICIDA MÍNIMAS DE ZEOCINA PARA A LEVEDURA *Saccharomyces boulardii*

PIRES, Cibele Ferreira¹; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo²; MOREIRA, Ângela Nunes³

¹ Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: cibipires@gmail.com

² Centro de Biotecnologia - UFPel. Email: frochedo@ufpel.edu.br

³ Faculdade de Nutrição e Centro de Biotecnologia - UFPel - Caixa Postal 354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS, Brasil. Email: angelanm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura que vem sendo utilizada como probiótico ou agente bioterapêutico, pois exerce efeitos benéficos à mucosa intestinal do hospedeiro, como incremento da resposta imune, da digestão e absorção de nutrientes (Buts & Keyser, 2006). Além disso, tem demonstrado eficácia na prevenção ou tratamento de várias desordens intestinais, tais como diarreia associada a antibióticos (McFarland et al., 1995), diarreia do viajante (Elmer & McFarland, 2001) e a pacientes alimentados por sondas (Bleichner et al., 1997), diarreia crônica em pacientes infectados pelo vírus HIV, gastroenterites agudas (Marchand & Vandenplas, 2000), doença de Crohn (Guslandi et al., 2000) e colite ulcerativa (Guslandi et al., 2003).

Probióticos recombinantes vêm sendo desenvolvidos visando a potencialização de sua ação ou a agregação de novos efeitos. Entretanto, vetores plasmidiais para expressão de proteínas heterólogas em *Saccharomyces boulardii* ainda não estão disponíveis. Com isso, a construção de uma cepa dessa levedura recombinante, capaz de expressar proteínas heterólogas de interesse, como proteínas terapêuticas ou imunogênicas e antígenos para serem utilizados na produção de vacinas e de insumos para diagnóstico, torna-se atrativa. Assim, em um estudo posterior, um plasmídeo para a expressão de proteínas heterólogas em *Saccharomyces boulardii* será construído e este apresentará um gene de resistência ao antimicrobiano Zeocina, para seleção das leveduras recombinantes.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar a menor concentração de Zeocina capaz de inibir o desenvolvimento e crescimento visível de *Saccharomyces boulardii* (concentração inibitória mínima - MIC) e a menor concentração de Zeocina capaz de matar a levedura (concentração fungicida mínima).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para utilização no experimento, *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foram recuperadas em caldo YPD por 48 h à 28°C, 150 rpm. Os cultivos das duas leveduras foram ajustados à transmissão de 95% a 530 nm com salina estéril.

2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração fungicida mínima de Zeocina para *Saccharomyces boulardii*

As concentrações inibitória e fungicida mínimas de Zeocina para a levedura *Saccharomyces boulardii* foram determinadas em caldo YPD, em duplicata, utilizando-se metodologia descrita por Shadomy e Espinel-Ingroff (1974), com modificações. A levedura *Pichia pastoris* foi utilizada como controle positivo do teste.

Doze tubos estéreis de 15 mL foram utilizados para o preparo das diferentes concentrações de Zeocina avaliadas. Uma solução de 10 mL do antimicrobiano Zeocina a 200 µg/mL em caldo YPD foi preparada. Foram adicionados 5 mL de caldo YPD estéril aos tubos 2 à 12 e 5 mL da solução de Zeocina a 200 µg/mL aos tubos 1 e 2. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo 2 e realizou-se diluições seriadas (base 2) da droga nos tubos restantes (5 mL), descartando-se 5 mL do último tubo. Dessa forma, as concentrações de Zeocina variaram de 0,05 a 200 µg/mL, ou seja, foram de 0,05; 1,5; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL.

Após o preparo das diferentes concentrações de Zeocina, 1 mL de cada diluição foram transferidos para 4 tubos estéreis mantendo-se o 1 mL restante como controle de contaminação da diluição seriada. Em outros 4 tubos estéreis, adicionou-se 1 mL de caldo YPD sem droga para uso como controle de crescimento das leveduras.

Após, 2 tubos de cada concentração de droga e 2 tubos contendo caldo YPD sem droga foram inoculados com 0,05 mL da suspensão de *Saccharomyces boulardii*. O mesmo procedimento foi realizado inoculando-se os tubos restantes com *Pichia pastoris*. Todos os tubos foram incubados a 28°C por 48 horas ou até surgimento visível de diferenças características de crescimento do microorganismo nos tubos controle, examinados e o MIC determinado.

A concentração fungicida mínima foi determinada a partir do subcultivo de 0,01 mL de cada tubo negativo e dos tubos controle de crescimento positivo em agar YPD livre de droga. Incubou-se as placas a 28°C por 48 horas ou até o crescimento dos cultivos provenientes dos tubos controle de crescimento positivo ser visivelmente aparente nas placas.

A concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração de droga a partir da qual os subcultivos apresentaram resultados negativos ou produziram menos de 3 colônias por placa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações inibitórias mínimas de Zeocina para as leveduras avaliadas, ou seja, as concentrações deste antimicrobiano capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foram de 50 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente (Tabela 1). Já em relação à concentração fungicida mínima, encontrou-se como dosagem letal valores a partir de 100 µg/mL e 25 µg/mL para *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações inibitória e fungicida mínimas de Zeocina para *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*.

	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	50	100
<i>Pichia pastoris</i>	6,25	25

Dessa forma, pode-se constatar que a levedura *Saccharomyces boulardii* avaliada no presente estudo apresentou uma resistência quatro vezes maior ao antimicrobiano Zeocina do que *Pichia pastoris*. Entretanto, apesar de as concentrações fungicidas mínimas de Zeocina encontradas para as leveduras do presente estudo serem elevadas, estas foram menores do que as observadas em um estudo de Lima (2006), o qual demonstrou concentração letal de Zeocina acima de 300 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida tropicalis* e de 200 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida guilliermondii*.

A concentração de Zeocina sugerida pelo fabricante do plasmídeo para a expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* (Invitrogen) para seleção desta levedura recombinante é de 100 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, quatro vezes maior do que a concentração fungicida mínima determinada no presente estudo. Dessa forma, concentrações maiores que 100 $\mu\text{g/mL}$ de Zeocina deverão ser utilizadas na seleção de *Saccharomyces boulardii* recombinantes, em estudo posterior a este, visto que a concentração fungicida mínima determinada no presente estudo para esta levedura foi quatro vezes maior do que a para *Pichia pastoris*.

4. CONCLUSÃO

Foram determinadas as concentrações inibitória e fungicida mínimas para *Saccharomyces boulardii*. Esta levedura apresentou uma elevada resistência ao antimicrobiano Zeocina, sendo sua concentração fungicida mínima quatro vezes maior do que a para *Pichia pastoris*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARON, M.; REYNES, J. P.; STASSI, D.; TIRABY, G. A selectable bifunctional beta-galactosidase:phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. **Elsevier Science B.V.** Gene, vol.114, n.2, p.239-243, 1992.

BLEICHNER, G; BLÉHAUT, H; MENTEC, et al. *Sacchromyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind-placebo-controlled trial. **Intensive Care Medicine**, vol.23, n.5, p.517-523, 1997.

BUTS, JP; KEYSER ND. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Diseases and Science**, vol.51, n.8, p.1485-1492, 2006.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Reviews**, vol.24, n.1, p.45-66, 2000.

COPPOLA M. M.; TURNES C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

ELMER, G.W; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea, **Gastroenterol Clin North Am**, vol.30, p.837-854, 2001.

GUSLANDI, M; GIOLLO, P; TESTONI, PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, vol.15, p.669-698, 2003.

GUSLANDI, M; MEZZI, G; SORGI, M; et al. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Dig Dis Sci**, vol.45, p.1462-1464, 2000.

LIMA, Luanne. **Estudos moleculares dos genes XYL1 e XYL2 de *Candida tropicalis* visando à produção de xilitol, Brasil**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia) - Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, Brasília.

MARCHAND, J; VANDENPLAS, Y. Micro-organisms administered in the benefit of the host: myths and facts, **Eur J Gastroenterol Hepatol**, vol.12, p.1077-1088, 2000.

McFarland, LV; Surawicz, CM; Greenberg, RN; et al. Prevention of β -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **Am J Gastroenterol**, vol.90, p.439-448, 1995.

MULSANT, P.; TIRABY, G.; KALLERHOFF, J.; PERRET, J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. **Journal Somatic Cell and Molecular Genetics**, vol.14, n.3, p.243-252, 1988.

PEREZ, P.; TIRABY, G.; KALLERHOFF, J.; PERRET, J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. **Plant Molecular Biology** vol.13, p.365-373, 1989.

SAAD, Susana M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, 2006.

SHADOMY, S., ESPINEL-INGROFF A. **Manual of Clinical Microbiology**. In: Lennett, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P. (Eds.), American Society of Microbiology, Washington DC, pp. 647-649, 1974.