

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Ciro Aranha Gomes

**Avaliação da atividade antibacteriana de óleos de leveduras coletadas  
no Rio Grande do Sul**

Porto Alegre

julho/2013

Ciro Aranha Gomes

**Avaliação da atividade antibacteriana de óleos de leveduras coletadas  
no Rio Grande do Sul**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra Gertrudes  
Corção

Porto Alegre

julho/2013

## Agradecimentos

Primeiramente aos professores e funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, peças chave na manutenção e no funcionamento da estrutura universitária, provendo as condições necessárias para a formação de profissionais capacitados a exercer as funções a que são atribuídos e também de pessoas capazes de contribuir à evolução sociocultural do estado e do país.

Dentro desse ambiente, um agradecimento especial para todos aqueles que fazem parte do curso de biomedicina da universidade, pelo seu constante esforço pela manutenção da qualidade do curso, visando sempre um aprimoramento para que a imagem do profissional biomédico seja a cada dia mais reconhecida e respeitada.

Como componente disso, incluem-se ainda os colegas de curso, devido ao convívio e auxílio, resultando em trocas de experiências fundamentais não só na formação acadêmica e profissional, mas também em aprendizados levados para situações enfrentadas em diversos ambientes fora da instituição.

Além desses, é necessário agradecer aos companheiros dos laboratórios frequentados ao longo do curso, assim como aos monitores, pela presença e ajuda muitas vezes incondicional, resultando em um aprendizado fundamental não só de execução das metodologias e compreensão de fundamentos teóricos, mas também de maneira de tratamento de alunos e colegas de trabalho.

Ainda, à família e aos amigos, pelo apoio nas várias decisões tomadas desde o início da graduação, bem como pelo aconselhamento em inúmeras questões enfrentadas ao longo de toda essa jornada.

Inclui-se também um agradecimento aos órgãos responsáveis pelo apoio financeiro ao projeto PRONEM nº 11/2047-0 à bolsa PIBITI/CNPq.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

## Índice

Resumo.....	6
Introdução compreensiva.....	7
Artigo.....	11
Introdução.....	11
Métodos.....	12
Resultados.....	15
Discussão.....	16
Referências.....	18
Conclusão e perspectivas.....	21
Anexo 1: Recomendações da revista.....	22

## Resumo

É notável a capacidade de diferentes espécies de levedura em assimilar fontes de carbono na forma de acúmulo de óleos. Tais óleos apresentam diversos potenciais biotecnológicos, dos quais é possível destacar a produção de substâncias potenciais para uso na forma de combustíveis (biodiesel), aditivos alimentares ou agentes antimicrobianos. Extratos contendo lipídeos produzidos por leveduras de amostras do queijo artesanal foram testados com intuito de verificar sua capacidade em inibir o crescimento de diferentes espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas, através de testes de disco-difusão em ágar Müller-Hinton. Como resultado, os extratos testados pareceram interferir no padrão de crescimento de *P. aeruginosa*, uma característica que não se confirmou quando testado em caldo Müller-Hinton. Sugere-se uma possível relação entre os microrganismos, mas que só pode ser confirmada após ser investigada em experimentos de interação entre a levedura e a bactéria.

**Palavras-chave:** óleos de levedura, potencial antimicrobiano, lipídeos, biotecnologia.

### Introdução compreensiva:

O desenvolvimento de mecanismos de defesa, sejam eles através de um sistema complexo envolvendo células especiais e moléculas de sinalização, ou apenas pela síntese e liberação de substâncias tóxicas a outros seres vivos, foi uma ferramenta de adaptação fundamental para a evolução e permanência de diversos organismos em seus ambientes. Sabe-se que apesar da maioria destes compostos serem de natureza protéica, existem evidências de que alguns lipídeos apresentam capacidade de inibição do crescimento e multiplicação de células microbianas [7].

Lipídeos são um grupo de biomoléculas agrupadas por semelhanças físico-químicas, em especial sua hidrofobicidade. Dessa forma, não há uma fórmula geral ou estrutura característica para esses compostos. A ação tóxica desses compostos é variável de acordo com algumas de suas características estruturais, tais como o tamanho da cadeia, o seu grau de instauração e a orientação espacial (cis ou trans) de ligações duplas. Seu modo de ação não é totalmente esclarecido, mas os resultados obtidos até o momento indicam que ácidos graxos livres sejam capazes de alterar a disposição física das membranas celulares, de forma a interferir em seus processos metabólicos, a exemplo da cadeia de transporte de elétrons, bem como promovendo mudanças em sua estrutura, o que compromete a integridade da célula. Acredita-se também que eles sejam capazes de alterar algumas rotas bioquímicas, através de inibições enzimáticas ou geração de subprodutos com atividade tóxica [4].

Verifica-se também que os ácidos graxos de cadeia longa parecem ter maior atividade antibacteriana, o que se confirma pelo fato de que os lipídeos com maior poder de inibição do crescimento bacteriano são, entre os saturados, o ácido cáprico (C10:0) e o ácido láurico (C12:0). Entre os monoinsaturados, os mais ativos são o ácido miristoléico (C14:1) e ácido palmitoléico (C16:1). Muitos ácidos graxos poliinsaturados com 18 e 20 carbonos também apresentem caráter antimicrobiano bastante potente. Adiciona-se ainda o fato de que, entre os insaturados, os que apresentam orientação espacial *cis* tem uma ação mais pronunciada em comparação aos orientados na forma *trans* [15].

Diversas publicações na literatura demonstram a ação antimicrobiana desses compostos, sendo, por exemplo, eficazes no controle do crescimento de culturas de *Helicobacter pylori* [18] e na inativação de *Chlamydia tracomatis* [2]. Derivados de ácidos graxos também demonstraram ser capazes de inibir a produção de biofilmes em cepas patogênicas de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [6], agentes de importância clínica causadores de gastroenterites e outros distúrbios digestivos.

Percebeu-se também que bactérias Gram negativas costumam apresentar maior resistência à ação dessas moléculas, o que pode ser explicado devido a sua diferença estrutural de parede celular. O recobrimento da camada de peptidoglicano por lipopolissacarídeos parece configurar uma dificuldade para que o óleo seja capaz de se infiltrar na célula, inibindo o crescimento do microrganismo. Essa hipótese pode ser confirmada pelo fato de que essa resistência é perdida quando bactérias



Gram negativas são tratadas com substâncias capazes de remover os lipopolissacarídeos da membrana externa (a exemplo do etilenodiaminotetrassulfato), tornando-as sensíveis aos ácidos graxos livres [17].

O mecanismo de ação inespecífico dos lipídeos como antimicrobianos os torna agentes bastante promissores, uma vez que isso dificulta o desenvolvimento de resistência. Além disso, a crescente demanda por produtos orgânicos os coloca como uma possível figura chave para o desenvolvimento de formas de conservação de alimentos sem o uso de conservantes químicos tradicionais como os nitritos, típicos aditivos nos processos de cura de carnes como embutidos [11].

Uma vez que os lipídeos estão presentes no metabolismo de todas as células, apresentando diversas funções, como a composição das membranas celulares e a reserva energética, todos os seres vivos são capazes de sintetizá-los. Contudo, poucos são capazes de atingir altas concentrações lipídicas no interior de suas células. Dentre esses, estão algumas espécies de leveduras, o que as coloca como importantes fontes de produção industrial de óleos, uma vez que são facilmente cultivadas e apresentam alto rendimento quando considerada a produção por área industrial ocupada. Algumas espécies de leveduras, como *Lipomyces starkeyi*, são capazes de acumular lipídeo até aproximadamente 70% de seu peso seco [1].

Leveduras são capazes de produzir lipídeos classificados em neutros (triglicerídeos) e polares (glicolipídeos e fosfolipídeos). A maior parte dessas biomoléculas é constituída por triglicerídeos saturados e monoinsaturados

(MUFAs). O principal fator determinante para a produção desses óleos é a relação entre carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura, sendo uma maior produção alcançada com altos teores de carbono e baixa concentração de nitrogênio. Isso se dá devido ao rápido esgotamento do nitrogênio pela levedura. Na escassez do nitrogênio e abundância de carbono, o microrganismo passa a assimilar o elemento em excesso na forma de triglicerídeos [16].

Visto que a produção industrial desses compostos deve ser feita a partir do cultivo de organismos cuja obtenção desses óleos seja a mais fácil, o uso de leveduras para a extração desses se apresenta bastante adequado por ser industrialmente viável e de baixo impacto social e ambiental. Dessa forma, o estudo em questão pretende avaliar o potencial antibacteriano de lipídeos extraídos de leveduras.

O potencial antimicrobiano desses extratos poderá ser utilizado de diversas formas, tendo um de seus principais alvos o controle do crescimento de microrganismos patogênicos. Embora o exemplo mais evidente pareça ser a formulação de novos fármacos antibióticos (para uso tópico ou sistêmico), é possível pensar em diversas outras aplicações clínicas dessas biomoléculas, como a limpeza de ambientes e equipamentos hospitalares, dificultando a fixação de bactérias e constituição de biofilmes, ou a higiene pessoal, na forma de aditivos em produtos para a limpeza bucal.

É notável também sua aplicação na pecuária, podendo ser utilizados como aditivos em rações, diminuindo a incidência de doenças nos animais de produção. Tal resultado pode ser obtido através da adição de ácidos

graxos de cadeia média no alimento servido às aves [19]. A adição de antibióticos (tetraciclina) na ração de aves já foi utilizada anteriormente, resultando em disseminação da resistência a essa molécula. Tal evento torna-se mais difícil devido à forma inespecífica de atuação dos ácidos graxos.

Além disso, será possível, através de estudos semelhantes, discutir as relações ecológicas possivelmente presentes entre essas leveduras e outros organismos que crescem no mesmo ambiente. O entendimento desses processos também pode ser de importância ambiental no que diz respeito à utilização do solo na agricultura e nos diferentes procedimentos que envolvem a captação, aproveitamento e escoamento da água utilizada em diversas atividades humanas, como o tratamento de efluentes, o engarrafamento para consumo de água mineral e a irrigação.

## Artigo

### Introdução:

Leveduras são organismos unicelulares capazes de produzir lipídeos com diversos potenciais biotecnológicos. Algumas espécies são capazes de acumular até 70% do seu peso seco em lipídeos [1]. Dentre esses potenciais, é notável a capacidade de alguns óleos microbianos em inibir o crescimento bacteriano [7]. Há ainda diversos outros relatos na literatura confirmando tal atividade [2; 6; 18]. Acredita-se que as bactérias Gram negativas sejam mais resistentes a esses extratos por possuírem uma membrana externa, uma vez que a remoção dessa camada diminui essa resistência [17].

Outra possível aplicação é a conservação de alimentos como substituto aos nitritos atualmente usados no processo de cura de carnes e embutidos [11]. Essas biomoléculas também podem atuar como aditivos alimentares em rações animais, diminuindo a incidência de infecções [19].

Este trabalho avalia a capacidade de óleos extraídos de uma levedura isolada de queijo artesanal em inibir oito espécies diferentes de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Os resultados obtidos em estudos como este podem ajudar na seleção de moléculas lipídicas promissoras para potencial uso em produtos de limpeza, higiene pessoal ou na conservação de alimentos.

### Métodos

#### a) Obtenção dos extratos:

Os óleos foram extraídos a partir do crescimento em diferentes condições de uma levedura coletada de queijo artesanal [8]. As condições de crescimento nas quais foram gerados os óleos testados são taxas carbono/nitrogênio de 10:1, 20:1, 100:1, 200:1 e 400:1. A extração foi feita em triplicata, gerando três alíquotas para cada condição. O protocolo utilizado para a extração foi adaptado de Bugh & Dyer [3], e executado no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### b.) Recuperação e identificação dos isolados bacterianos:

As espécies a serem testadas foram recuperadas de estoques em glicerol (15%) e cultivadas em caldo BHI por um período de 24-48h, até ser observada turvação no meio. A partir disso, foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-TSA, através de esgotamento para isolamento de colônias. Colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram para verificar sua morfologia e pureza da colônia. Algumas espécies foram submetidas também a testes bioquímicos para confirmação: *Enterobacter aerogenes* foi submetido ao teste de Rugai-lisina e *Enterococcus faecium* à prova da catalase. As cepas utilizadas estão listadas abaixo:

- *Bacillus licheniformes* – ATCC 678576
- *Bacillus cereus* – ATCC 11778
- *Staphylococcus aureus* - ATCC 14458
- *Acinetobacter baumannii* - ATCC 19606
- *Shigella flexneri* - ATCC 12022
- *Enterobacter aerogenes* - ATCC 13048
- *Enterococcus faecium* - ATCC 6569
- *Pseudomonas aeruginosa* DCM L10

c.) Suspensão dos extratos brutos dos óleos

Para a obtenção dos extratos em forma líquida, se fez necessário suspendê-los em n-hexano. Para isso, cada alíquota extraída foi pesada para que fosse possível calcular o volume necessário de solvente para que todas as amostras tivessem a mesma concentração. Para isso, escolheu-se a amostra com menor massa, e a seguir adicionou-se 1mL de solvente. A partir da concentração obtida, foi calculado o valor a ser adicionado nas outras amostras (Tabela 1).

d.) Teste da toxicidade do solvente n-hexano:

Para verificar a possibilidade de ação antibacteriana do solvente usado, a fim de excluir sua interferência nos testes de atividade dos óleos, as bactérias foram cultivadas em soluções com quantidades crescentes de n-hexano. Em uma placa de 96 poços, foram distribuídas soluções contendo 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,1562%, 0,0712% e 0,0391% de n-hexano

Tabela 1 - Volume adicionado de n-hexano para o ajuste de concentração.

Amostra	Massa (g)	Volume adicionado (ml)	Concentração (g/ml)
10.1 a	0,3553	2,860709	0,1242
10.1 b	0,2085	1,678744	0,1242
10.1 c	0,1907	1,535427	0,1242
20.1 a	0,2029	1,633655	0,1242
20.1 b	0,1909	1,537037	0,1242
20.1 c	0,1955	1,574074	0,1242
100.1 a	0,1652	1,330113	0,1242
100.1 b	0,179	1,441224	0,1242
100.1 c	0,1662	1,338164	0,1242
200.1 a	0,1417	1,140902	0,1242
200.1 b	0,1733	1,39533	0,1242
200.1 c	0,151	1,215781	0,1242
400.1 a	0,1242	1	0,1242
400.1 b	0,141	1,135266	0,1242
400.1 c	0,1276	1,027375	0,1242

em caldo Müller-Hinton. As cepas em teste foram cultivadas por 24h em ágar TSA-inclinado a 37°C e suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) até atingirem a concentração 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $10^8$  células / ml). Após, uma alíquota dessa solução foi colocada nos poços contendo 200µL das soluções de n-hexano e caldo. Como controles, utilizaram-se dois poços: um contendo apenas o caldo, e outro contendo caldo com solução de bactérias. Para a avaliação da presença de células viáveis, adicionou-se 24h após a incubação a 35°C o indicador cloreto de tetrazólio, um aceptor de elétrons capaz de identificar a ação do metabolismo bacteriano por mudança de cor na solução.

e.) Análise da atividade antibacteriana pelo teste de disco-difusão em ágar:

Para a triagem dos óleos potencialmente ativos na inibição do crescimento bacteriano, foi realizado o teste de disco-difusão em ágar. Para esse teste, as bactérias foram cultivadas por 24h em ágar TSA-inclinado sob a temperatura de 37°C. Posteriormente, elas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) até atingirem a concentração 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $10^8$  células / ml). Feito isso, um suabe estéril foi imerso na solução e estriado em uma placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Após a semeadura, discos de papel estéreis foram posicionados e fixados no ágar. A

cada um desses discos adicionou-se 15µL de amostra de óleo (1,86 mg), sendo usado um disco para cada amostra. A um dos discos foi adicionado apenas n-hexano, para se descontar uma potencial interferência do diluente no resultado. Como controle positivo utilizou-se um disco de gentamicina 10 mcg. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. Após esse tempo, observou-se o surgimento de alguma alteração no crescimento bacteriano ao redor dos discos.

f.) Análise da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo:

Para validar a verificação do potencial antibacteriano do extrato, foi realizado o teste de inibição em caldo, no qual as bactérias foram cultivadas em meio líquido contendo o óleo. O crescimento das bactérias foi feito em placa de Petri contendo ágar-TSA por 24h a 37°C, seguido de suspensão em solução salina até a concentração 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $10^8$  células / ml). A suspensão obtida foi diluída novamente para se obter uma concentração de 1:10. Uma alíquota de 5µL dessa solução foi adicionada a uma placa de 96 poços contendo soluções compostas por caldo Müller-Hinton e extrato bruto de óleo de levedura (0,1242g/ml), em volumes iguais (50µL de cada). Para controle, usou-se um poço contendo apenas caldo e outro com caldo e bactéria. A placa foi incubada a 35°C por 24h para posteriormente ser realizada a leitura dos dados obtidos. O resultado foi avaliado através da adição de cloreto de tetrazólio aos poços. Ele é um acceptor de elétrons que apresenta coloração vermelha quando reduzido pela ação do metabolismo bacteriano. A detecção dessa cor indica que o meio contém bactérias em atividade e crescimento.

Resultados:

As cepas tiveram sua identidade confirmada e foram expostas aos testes descritos. Elas também se mostraram resistentes ao solvente n-hexano até a concentração máxima testada (20%). As espécies em questão, cuja sensibilidade à gentamicina foi testada previamente em um ensaio de disco-difusão, mostraram inibição na presença do disco do antibiótico, de forma a confirmar o controle e validar o experimento. Os diâmetros dos halos de inibição para gentamicina estão listados a seguir:

*B. licheniformes*: 22 a 25mm

*B. cereus*: 23mm

*S. aureus*: 24mm

*A. baumannii*: 21mm

*S. flexneri*: 15mm

*E. aerogenes*: 19mm

*E. faecium*: 17mm

*P. aeruginosa*: 18mm

No teste de avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, foi observado crescimento normal ao redor dos discos contendo óleos de leveduras para todas as bactérias testadas, à exceção das placas contendo cultivo de *P. aeruginosa*. Nas placas em que esse micro-organismo foi testado, foi possível observar uma densidade de crescimento ligeiramente menor nas proximidades dos discos. Esse padrão de crescimento não foi observado da mesma forma nos arredores do disco contendo n-hexano. A interferência no crescimento da bactéria nas imediações dos discos contendo os extratos, entretanto, não reflete um padrão comparável à inibição obtida pela gentamicina.

O cultivo de *P. aeruginosa* em caldo contendo óleo de levedura indicou crescimento da bactéria em todos os extratos utilizados, bem como no controle contendo apenas caldo Müller-Hinton. O poço incubado apenas com o caldo Müller-Hinton, sem adição de bactérias, não mostrou nenhum crescimento bacteriano, validando o experimento.

#### Discussão:

Diante dos resultados obtidos, acredita-se que o extrato testado não apresenta atividade antibacteriana para a maioria das cepas testadas. Isso pode ser explicado pela composição do óleo, uma vez que o perfil dos ácidos graxos por cromatografia gasosa indicou que as amostras testadas apresentavam como maior componente o ácido oleico (18:1 n9C),  $32.23 \pm 1.05$  % (ROSA, comunicação pessoal, dados não publicados).

Outras fontes na literatura também demonstram resultados negativos em relação à atividade antibacteriana dessa molécula: algumas bactérias Gram-positivas envolvidas na deterioração de carnes são resistentes aos ácidos oleico, palmítico, esteárico e mirístico, e sensíveis aos ácidos láurico e palmitoléico [12]. A reduzida atividade antibacteriana do ácido oleico pode ser explicada pelo seu



menor grau de insaturação, visto que os ácidos graxos de 18 carbonos contendo mais de uma ligação dupla (linolênico e linoleico) têm seu caráter tóxico para as células bacterianas aumentado à medida que se aumenta o número de insaturações nas suas cadeias [20].

Dessa forma, apesar de haver um forte indício na literatura [7; 10] de que os ácidos graxos de cadeia longa são, em geral, mais ativos (maior potencial de inibição bacteriana), os outros fatores (grau de insaturação, hidrofobicidade) também devem ser levados em conta na predição do caráter antibacteriano da molécula.

O ácido láurico também se mostrou ativo contra *B. cereus* e *L. monocytogenes* [13], Nesse estudo ele também foi capaz de inibir *E. coli* e *S. enteritidis*, duas bactérias Gram-negativas, contrariando a ideia de que a camada externa dessas células conferem proteção contra ácidos graxos de cadeia média ou longa [16].

Os resultados obtidos ainda parecem apontar uma possível interferência do óleo no crescimento de *P. aeruginosa*, porém insuficiente para inibir seu crescimento nas concentrações usadas no experimento. O fato de apenas essa bactéria ser afetada pelo óleo pode indicar uma possível relação ecológica de amensalismo (antibiose) entre a levedura e a bactéria. Para se verificar a existência dessa relação, é necessário um ensaio de interação e crescimento conjunto das espécies, de forma a verificar alterações no padrão de síntese desses óleos e no crescimento da bactéria.

O controle da proliferação de *P. aeruginosa* no solo é de importância na agricultura, uma vez que essa bactéria pode utilizar o nitrato fixado a partir do nitrogênio para obter energia, em uma reação de desnitrificação, que tem como produto o nitrogênio gasoso. Esse processo é inverso à fixação de nitrogênio feita no solo para a absorção do elemento pelas plantas, processo fundamental para o desenvolvimento dos vegetais. Dessa forma, solos com grandes agregados populacionais de *P. aeruginosa* tendem a ser pobres em nitrogênio, dificultando o crescimento das plantas cultivadas no solo. A possibilidade de se utilizar uma levedura como controle biológico para a bactéria pode minimizar a necessidade de se usar fertilizantes em solos pobres em nitrogênio.

Por outro lado, a *P. aeruginosa* é também de extrema importância na clínica, visto que ela é capaz de levar a diversas patologias infecciosas, incluindo infecções do trato respiratório [14]. Sabe-se também que ela apresenta uma notável capacidade de constituir biofilmes [5], que são associações entre células bacterianas nas quais há a secreção de uma matriz de agregação e nutrição, promovendo a adesão de uma comunidade bacteriana em uma superfície. Uma vez aderidas e agregadas, essas

células constituem uma estrutura de difícil remoção, uma vez que ela se torna mais resistente a antibióticos devido à dificuldade da penetração da molécula na matriz. A formação de biofilmes é bastante preocupante em ambientes hospitalares, pois o estabelecimento dessas estruturas em cateteres, tubos e outros utensílios constitui um perigo de contaminação para os pacientes expostos a procedimentos que envolvam essas peças. Acredita-se que a melhor forma de combate a um biofilme é impedir sua formação, o que envolve um controle direto sobre a proliferação das bactérias formadoras da estrutura, motivo pelo qual se torna importante o desenvolvimento de estratégias capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar.

Soma-se ainda o fato de que essa bactéria é um importante contaminante de alimentos, levando a intoxicações alimentares [9]. O controle do crescimento desse patógeno é, portanto, de interesse para a saúde humana e também para o aumento da vida de prateleira dos alimentos industrializados, sendo, por consequência, um assunto de interesse para a economia do Brasil.

Devido a esses três cenários em que o controle do crescimento da bactéria é de interesse nas atividades humanas, tanto do ponto de vista socioeconômico quanto da saúde, torna-se interessante verificar a existência de uma atividade antimicrobiana do óleo da levedura específica a essa espécie, de forma a permitir a descoberta de mecanismos capazes de controlar a multiplicação de *P. aeruginosa*.

#### Referências

- 1.) Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach, and G. M. Guebitz. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. V. 99, p.3051-3056, 2008.
- 2.) Bergsson G, Arnfinnsson J, Karlsson SM, Steingrímsson O, Thormar H. 1998. *In vitro* inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2290–2294.
- 3.) BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiological.* v. 27, p. 911-917, 1959.

- 4.) Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(6):1629–1642. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3.
- 5.) Drenkard E, Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740–743.
- 6.) Furukawa S, Akiyoshi Y, O'Toole GA, Ogihara H, Morinaga Y. 2010. Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 138:176–180.
- 7.) Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2:23–28.
- 8.) Landell M.F., Hartfelder C. & Valente P. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Rio Grande do Sul. Acta Scientiae Veterinariae.* N. 34, p.49-55, 2005.
- 9.) MAIA, Adriana de Araújo et al. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2009, vol.29, n.1 [cited 2013-06-15], pp. 114-119 .
- 10.) Nieman, C. 1954. Influence of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 18:147-163.
- 11.) OLIVEIRA, Milyan Jorge de; ARAUJO, Wilma M. C.; BORGIO, Luiz Antônio. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas,* v. 25, n. 4, p. 736-742, out./dez. 2005.
- 12.) Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Bégin A (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International journal of food microbiology*37: 155–162.
- 13.) Parfene, G.; Horincar, V.; Tyagi, AK; Malik, A.; Bahrim, G. Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.* 2013 Feb 15;136(3-4):1345-9. doi: 0.1016/j.foodchem.2012.09.057. Epub 2012 Sep 28.
- 14.) Prince, A. 1992. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microb. Pathog.* 13:251–260.

- 15.) Rosa, Priscila Dallé da. Seleção de leveduras oleaginosas isoladas de queijo artesanal produzido no Rio Grande do Sul, Brasil . 2011. 57f. Trabalho de conclusão(graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, BR-RS, 2011. Orient.: Silva, Patrícia Valente da. Co-Orient.: Poli, Jandora Severo.
- 16.) Russel, A. D. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non antibiotics: Food additives and food pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 191–201.
- 17.) Sheu CW, Freese E. Lipopolysaccharide Layer Protection of Gram-Negative Bacteria Against Inhibition by Long-Chain Fatty Acids. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, USA, V. 115, n. 3, p. 869-875, 1997.
- 18.) Sun C, O'Connor C, Robertson A. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immun Med Microb.* 2003;36:9–17.
- 19.) Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol.* V. 39, n.2, p.117-21, 2010.
- 20.) Wang, L., Johnson, E.A., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 624–629.

## Conclusões e perspectivas

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que as amostras de extrato bruto dos óleos extraídos de leveduras não foram capazes de inibir o crescimento das cepas bacterianas testadas. Todavia torna-se necessário um estudo mais específico para se verificar a existência de uma relação ecológica responsável pela inibição de *Pseudomonas aeruginosa* pela levedura produtora do extrato bruto. Os resultados não são claros para se afirmar a existência desse evento, mas parecem sugerir que a bactéria pode ter seu padrão de crescimento alterado pela produção de substâncias lipídicas pela levedura.

## Anexo 1: Recomendações da revista (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology)

### Editorial Procedure

Upon receipt, manuscripts will be assigned a manuscript tracking number and forwarded to a Senior Editor. The corresponding author will be notified via e-mail when the manuscript is received and informed of the manuscript tracking number and the Senior Editor who will be handling the review. Queries regarding the review and revisions of the manuscript should be directed to the Senior Editor. The manuscript tracking number should be included in all correspondence regarding the submission.

The Senior Editor advises the corresponding author of his/her and the reviewers' comments. If minor or major revisions are recommended, revised manuscripts should be returned to the Senior Editor handling the manuscript. Revised manuscripts should be submitted directly to the Senior Editor as e-mail attachments. At this point in the review process, higher-quality figures may be requested if necessary. Accepted manuscripts will not be forwarded to the publisher without an electronic copy of the final revision. Papers that do not conform to the journal norms will be returned to the authors for revision before being considered for publication. When the Senior Editor is satisfied that the manuscript is ready for acceptance, s/he forwards it to the Editor-in-Chief for final acceptance.

### Types of Papers

The journal accepts manuscripts for the following sections:

- Original Papers should normally not exceed 16 printed pages (one printed page corresponds to about 4300 characters respectively 750 words, font size 10 point Times Roman of text or 3 illustrations with their legends).
- Short Communications should not exceed 3 printed pages.
- Letters to the Editor should not exceed 2 printed pages.
- Review Papers, including mini-reviews, should be critical reviews on subjects of interest to industrial and applied microbiologists. The length of the article will depend on the subject. Authors considering preparation of a review should contact the Editor-in-Chief in advance to determine the suitability of the topic.

All manuscripts are subject to copy-editing after acceptance.

### Manuscript submission

## Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include

evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

## Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- **Introduction**  
The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature. It should conclude with a concise statement of the author’s objectives.
- **Materials and Methods**  
The Materials and Methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The name of suppliers or sources of equipment and chemicals should be given parenthetically, with the city, state/province/county and country. This information need not be given for common equipment found in most laboratories (balances, pH meters, spectrophotometers) or common chemicals (NaCl, DNA) the source of which is not crucial to repetition of the work. The grade of chemicals should be stated if it is important for repetition of the work.
- **Results**  
Present your findings, stating the major trends shown by data in figures or tables, but do not repeat in the text data that are obvious from the figures or tables. The number of replicates involved and the number of independent repetitions of the experiment or measurement should be stated here or as a footnote to a table.
- **Discussion**  
State your conclusions from the data and discuss how they compare with previously published information on the subject. If appropriate, suggest theoretical implications and propose future studies. It may be appropriate to combine Results and Discussion, particularly where the results of one experiment are the basis for the next experiment reported in this paper.

## Keywords

Please provide up to 5 keywords which can be used for indexing purposes.

## Acknowledgements

These should be as brief as possible. Any grant that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organizations should be written in full.

In case a multi-author manuscript is submitted authors should state that all authors have agreed to submit this manuscript to the "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology".

Text

## Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## Additional Formatting Instructions for JIMB

- Please note that all lines need to be sequentially numbered and double-spaced.



## References

### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work and numbered consecutively.

- **Journal article**  
 Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
 Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- **Article by DOI**  
 Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. Doi:10.1007/s001090000086
- **Book**  
 South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**  
 Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**  
 Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title\\_of\\_subordinate\\_document](http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document).  
 Accessed 15 Jan 1999

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)  
 For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

#### Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

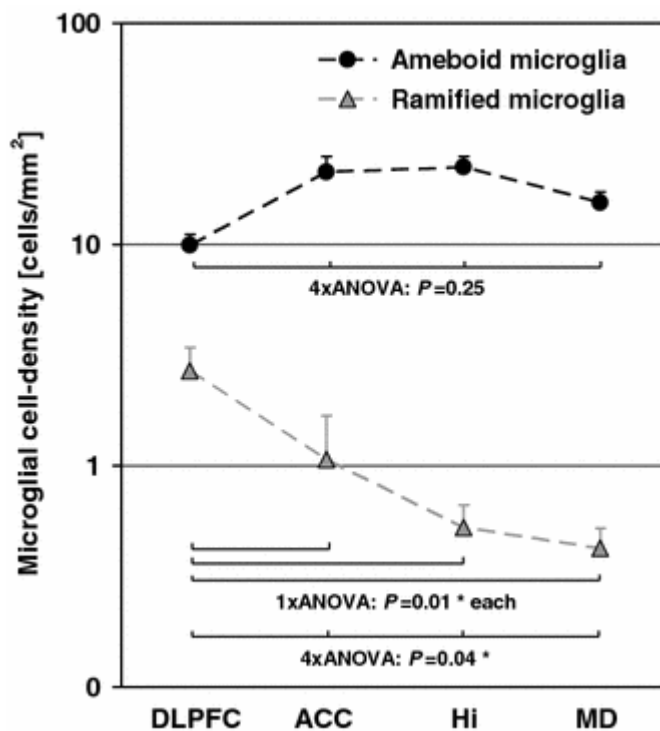
#### Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

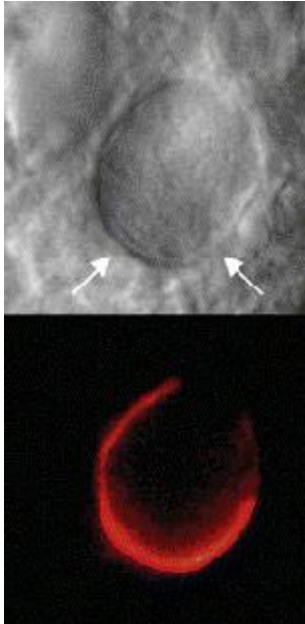
### Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

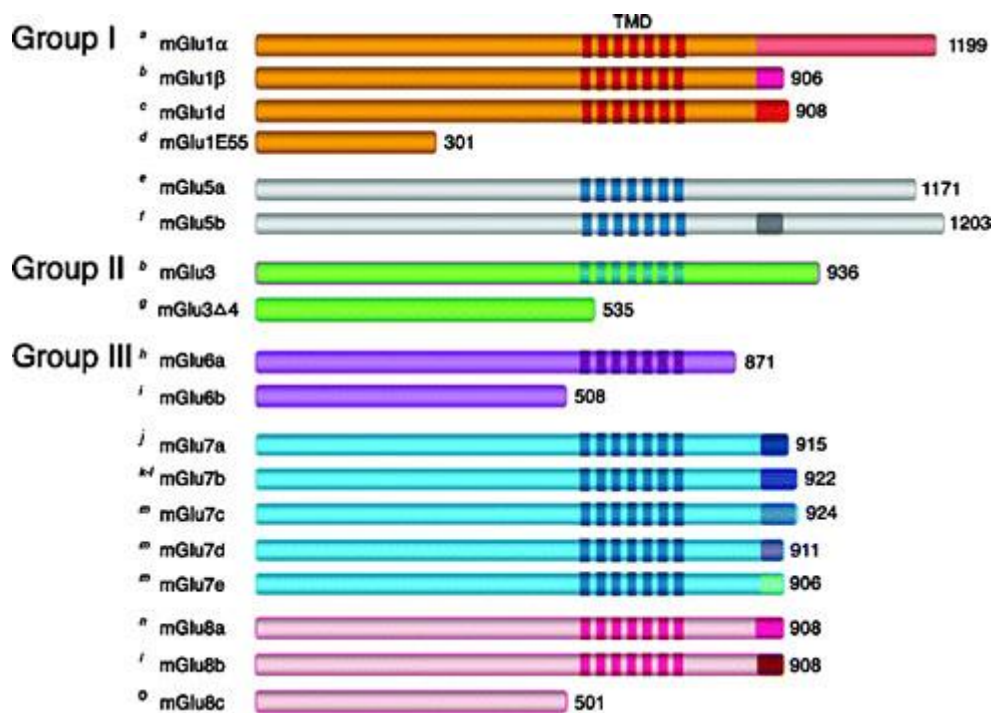
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

## Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

## Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

## Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

## Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

## Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

## Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

## Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

## Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

## Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

## Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

## Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

## Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

## Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

## Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

## Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

## Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

## Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

## Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

## Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

## Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

## Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

## Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

## Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Integrity of research and reporting

## Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

## Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest