



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Viviani Tadioto

**Avaliação do Potencial Citotóxico, Antibacteriano e Antioxidante de Extratos
Celulares de Leveduras Brasileiras**

Florianópolis, SC
2024

Viviani Tadioto

**Avaliação do Potencial Citotóxico, Antibacteriano e Antioxidante de Extratos
Celulares de Leveduras Brasileiras**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociência da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências na área de concentração: Prospecção e desenvolvimento de bioprodutos.

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior.

Coorientadoras: Profa. Dra. Gislaine Fongaro e Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva.

Florianópolis, SC

2024

Tadioto, Viviani

Avaliação do Potencial Citotóxico, Antibacteriano e Antioxidante de Extratos Celulares de Leveduras Brasileiras / Viviani Tadioto ; orientador, Sérgio Luiz Alves Júnior, coorientadora, Gislaine Fongaro, coorientadora, Izabella Thais da Silva, 2024.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Produção de extratos celulares apartir da biomassa de leveduras da biodiversidade brasileira. 3. Atividade antioxidante. 4. Estudo da citotoxicidade dos extratos celulares. 5. Redução de biofilme em materiais biomédicos. I. Alves Júnior, Sérgio Luiz. II. Fongaro, Gislaine. III. da Silva, Izabella Thais IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. V. Título.

Viviani Tadioto

Título: Avaliação do Potencial Citotóxico, Antibacteriano e Antioxidante de Extratos Celulares de Leveduras Brasileiras

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 20 de agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Mário Steindel

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Margarete Dulce Bagatini

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Stoco

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dr.(a) Angela Alves dos Santos

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências pelo Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia e Biociências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior
Orientador(a)

Florianópolis/SC, 2024.

Dedico essa dissertação de mestrado a todas as pessoas que eu conheci nesse período; cada uma me mostrou algo novo e importante.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos àqueles que contribuíram e continuam a contribuir significativamente para o progresso desta dissertação.

À minha família, Pai, Mãe, Edson, Cleverson, Dione e Dani, pelo amor incondicional, apoio e suporte constantes ao longo da minha vida e da minha jornada acadêmica.

Aos meus sobrinhos queridos, Tales, Maria Clara e Igor, pelo carinho e confiança que depositam na tia Vivi.

Ao meu noivo Rodrigo pelo amor, pela compreensão constante, pela paciência e apoio em cada uma das etapas; sua presença e dedicação são fundamentais para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, pela paciência, conhecimento e dedicação, e pelo incentivo que recebo constantemente de ti; pelas oportunidades, além de tudo, por ser um exemplo de ética e persistência e fonte de inspiração para mim.

À minha coorientadora Profa. Dra. Gislaine Fongaro, por ter me recebido no Laboratório de Virologia Aplicada, pela atenção e tempo concedido, pelas oportunidades, pelas discussões sinceras e construtivas; sua dedicação é fonte de inspiração para mim.

À minha coorientadora Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva, por todos os ensinamentos, pela paciência, por me apresentar ao Laboratório de Farmacognosia. Agradeço também à Ingrid, aos professores e a técnica Samira deste laboratório.

Ao professor Prof. Dr. Boris U. Stambuk e alunos do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, por me receberem e concederem o acesso aos seus laboratórios, pelo suporte, atenção e amizade, pelas trocas de experiências.

Aos meus queridos amigos Amanda, Joana, Miguel, Ângela, Anderson e Gabriel, sou muito feliz por ter encontrado vocês; dificilmente vou encontrar adjetivos para descrever a gratidão que sinto por todo o carinho e companheirismo que encontrei em vocês. O apoio foi inestimável. Com vocês, eu aprendi e cresci. Obrigada por alegrarem meus dias; vocês são essenciais e incríveis.

Agradeço aos meus amigos que também me apoiaram durante este processo em particular. Gostaria de agradecer a Emili, Lois, Yasmin, Helena, Estevão e Artur pelas contribuições e carinho de cada um vocês.

Aos colegas dos Laboratórios de Bioquímica de Leveduras e de Virologia aplicada (2022-2024) pelas contribuições diretas e indiretas, em especial aos que me receberam de braços abertos.

À banca de qualificação, Dra. Angela Alves dos Santos, Profa. Dra. Patrícia Hermes Stoco, Prof. Dr. Mário Steindel e Dr. Eduardo Zanella, pelas valiosas contribuições ao projeto.

Aos membros da banca examinadora da defesa, Prof. Dr. Mário Steindel, Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini, Profa. Dra. Patrícia Hermes Stoco e Dra. Angela Alves dos Santos, por aceitarem o convite e contribuírem examinando esta dissertação de mestrado.

À Universidade Federal de Santa Catarina e à Universidade Federal da Fronteira Sul, à Coordenação e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, à Secretaria de Pós-Graduação, ao MIP/UFSC, a aos servidores e terceirizados dos vários setores, em especial os do LMEB, LCME da UFSC; da Central Analítica da UFFS, aos professores do PPGBTC pelas oportunidades, atenção e aprendizados em ambientes motivadores e desafiadores.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) “Leveduras: Biodiversidade, preservação e inovação biotecnológica”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Sem a levedura, a Terra seria um planeta sem álcool e todo pedaço de pão não seria fermentado. Nos dias de hoje, a levedura tornou-se a queridinha da biotecnologia, produzindo uma lista enorme de fármacos que salvam vidas, além de bilhões de litros de biocombustíveis que nos ajudam na tentativa de desacelerarmos as mudanças climáticas. (Money, 2018, 15.)

RESUMO

Leveduras possuem papéis essenciais em ambientes naturais e industriais, gerando metabólitos bioativos aplicáveis em setores farmacêuticos e alimentícios. Esses compostos influenciam processos e interações biológicas que podem beneficiar a saúde humana. A facilidade de empregar leveduras em processos fermentativos as torna promissoras para aplicações industriais; entretanto, a falta de conhecimento sobre seus compostos bioativos limita seu uso, apesar de relatos de eficácia antibacteriana, antioxidante e anticâncer. Considerando (i) a estreita relação das leveduras com processos fermentativos, (ii) a abundância da biomassa celular residual nas indústrias de fermentação e (iii) a quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados pela atividade agroindustrial no Brasil, este estudo avaliou *in vitro* as atividades antitumorais, antioxidantes e antibacterianas de extratos de células de seis linhagens de leveduras selvagens isoladas de insetos, de flores e da indústria sucroalcooleira. Três das linhagens utilizadas foram identificadas taxonomicamente em estudos prévios como *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), *Papiliotrema laurentii* (CHAP-158) e *Meyerozyma caribbica* (CHAP-204); as outras três foram identificadas durante o presente estudo como *Rhodotorula* sp. (CHAP-208), *Aureobasidium* sp. (CHAP-221) e *Meyerozyma* sp. (CHAP-243). Para a produção dos extratos, as linhagens foram cultivadas em meios contendo glicose e xilose, os dois açúcares mais abundantes em resíduos lignocelulósicos agroindustriais. A extração dos compostos intracelulares das leveduras foi realizada com três solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e butanol. Nos ensaios *in vitro* foram avaliadas: (a) a citotoxicidade dos extratos em células de carcinoma pulmonar humano (A549), fibroblastos de macaco (VERO) e macrófagos murino (RAW); (b) a avaliação de atividade contra espécies reativas de oxigênio (EROs); e, (c) a redução de biofilme formado em titânio e poliestireno por *Pseudomonas aeruginosa*. Os compostos presentes nos extratos foram analisados por HPLC, e os sobrenadantes dos cultivos, por GC-MS. Os fracionamentos aquosos das linhagens PE-2 e CHAP-204 reduziram a viabilidade de células tumorais, com concentração inibitórias de 50% (CI₅₀) de 90,42 µg/mL e 107,5 µg/mL, respectivamente. Quatro extratos celulares (das cepas CHAP-158, CHAP-204 e CHAP-243 em acetato de etila e da cepa CHAP-243 em butanol) demonstraram atividade antioxidante em células do sistema imunológico. Adicionalmente, os extratos testados reduziram a formação de biofilme formado por *P. aeruginosa* em superfícies de polipropileno e titânio. Em titânio, a fração aquosa da CHAP-204 e os extratos da CHAP-208 em butanol e da PE-02 em acetato de etila reduziram a viabilidade bacteriana em 77,58%, 83,99% e 66,19%, respectivamente. Em polipropileno, o extrato aquoso da CHAP-243 reduziu o biofilme em 70%, enquanto o da CHAP-243 em butanol e o aquoso da CHAP-158 reduziram em 64,87% e 61,59%, respectivamente. Os compostos fenólicos detectados por HPLC foram ácido p-cumárico, epicatequina, ácido caféico, kaempferol, miricetina e quercetina. Nas análises em GC-MS, o 2-feniletanol foi o composto mais prevalente nos sobrenadantes dos cultivos, variando de 21,02% a 85,81% de abundância relativa. Esses resultados ampliam o entendimento dos compostos bioativos produzidos por leveduras selvagens e valorizam a biodiversidade microbiana brasileira, promovendo alternativas para uma economia circular por meio do aproveitamento de biomassas residuais da indústria sucroenergética.

Palavras-chave: ácido p-cumarico, epicatequina, 2-feniletanol, *Pseudomonas aeruginosa*, biodiversidade, biomassa residual.

ABSTRACT

Yeasts play essential roles in natural and industrial environments, generating bioactive metabolites applicable in the pharmaceutical and food sectors. These compounds influence biological processes and interactions that can benefit human health. The ease of employing yeasts in fermentation processes makes them promising for industrial applications; however, the lack of knowledge about their bioactive compounds limits their use, despite reports of antibacterial, antioxidant, and anticancer efficacy. Considering (i) the close relationship of yeasts with fermentation processes, (ii) the abundance of residual cell biomass in fermentation industries, and (iii) the amount of lignocellulosic waste generated by agro-industrial activity in Brazil, this study evaluated in vitro the antitumor, antioxidant, and antibacterial activities of yeast-cell extracts from six wild strains isolated from insects, flowers, and the fuel-ethanol industry. Three of the strains were taxonomically identified in previous studies as *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), *Papiliotrema laurentii* (CHAP-158), and *Meyerozyma caribbica* (CHAP-204); the other three were identified during this study as *Rhodotorula* sp. (CHAP-208), *Aureobasidium* sp. (CHAP-221), and *Meyerozyma* sp. (CHAP-243). For the extracts' production, the strains were grown in media containing glucose and xylose, the two most abundant sugars in agroindustrial wastes. The extraction of intracellular yeast compounds was carried out with three organic solvents: hexane, ethyl acetate, and butanol. The in vitro assays evaluated (a) the extracts' cytotoxicity on human lung carcinoma cells (A549), monkey fibroblasts (VERO), and murine macrophages (RAW); (b) the evaluation of activity against reactive oxygen species (ROS); and (c) the reduction of biofilm formed on titanium and polystyrene by *Pseudomonas aeruginosa*. The compounds present in the extracts were analyzed through HPLC, and the culture supernatants through GC-MS. The aqueous fractions from strains PE-2 and CHAP-204 reduced the viability of tumor cells, with 50% inhibitory concentrations (CI₅₀) of 90.42 µg/mL and 107.5 µg/mL, respectively. Four cell extracts (from strains CHAP-158, CHAP-204, and CHAP-243 in ethyl acetate and strain CHAP-243 in butanol) demonstrated antioxidant activity in immune system cells. Additionally, the extracts reduced the biofilm formed by *P. aeruginosa* on polypropylene and titanium surfaces. On titanium, the extracts from CHAP-204 in water, CHAP-208 in butanol, and PE-02 in ethyl acetate reduced bacterial viability by 77.58%, 83.99%, and 66.19%, respectively. On polypropylene, the aqueous extract from CHAP-243 reduced biofilm by 70%, while the extracts from CHAP-243 in butanol and CHAP-158 in water reduced the biofilms by 64.87% and 61.59%, respectively. The phenolic compounds detected by HPLC were p-coumaric acid, epicatechin, caffeic acid, kaempferol, myricetin, and quercetin. In GC-MS analyses, 2-phenylethanol was the most prevalent compound in the culture supernatants, ranging from 21.02% to 85.81% relative abundance. These results increase the understanding of the bioactive compounds produced by wild yeasts and the value of Brazilian microbial biodiversity, promoting alternatives for a circular economy and taking advantage of residual biomass from the sugar-energy industry.

Keywords: p-coumaric acid, 2-phenylethanol, epicatechin, *Pseudomonas aeruginosa*, biodiversity, residual biomass.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Cladograma construído a partir das sequências ITS das linhagens objeto deste estudo (CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-2) e das cepas padrão das espécies mais intimamente relacionadas. Abreviações dos gêneros: *R.*, *Rhodotorula*; *P.*, *Papiliotrema*; *A.*, *Aureobasidium*; *S.*, *Saccharomyces*; *D.*, *Debaryomyces*; e, *M.*, *Meyerozyma*. Os códigos à esquerda do nome das espécies representam os números de depósito no GenBank. Os ramos em azul pertencem ao Filo Ascomycota e em vermelho, ao Filo Basidiomycota. Na árvore, também estão demarcados os clados que pertencem às famílias Sporidiobolaceae, Rhynchogastremaceae, Saccotheciaceae, Saccharomycetaceae e Debaryomycetaceae, e às ordens Sporidiobolales, Tremellales, Dothideales e Saccharomycetales. Os círculos lilases nos nós internos representam os valores de bootstrap baseados em mil réplicas.43
- Figura 2 – Detecção de ERO em linhagem de macrófagos (RAW) diante dos extratos produzidos. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).49
- Figura 3 – Micrografias de superfícies de discos de titânio após os tratamentos com os extratos de leveduras mostrando a atividade de desagregação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Em cada tratamento, a linha superior corresponde a aumento de 5.000 vezes e a linha inferior, a aumento de 1.000 vezes.50
- Figura 4 – Avaliação da redução de *P. aeruginosa* em superfícies de titânio tratadas com extratos celulares de leveduras. Diferentes letras minúsculas próximas às barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).51
- Figura 5 – Avaliação da redução de *P. aeruginosa* em superfícies de polipropileno tratadas com extratos celulares de leveduras. Diferentes letras minúsculas próximas às barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).52
- Figura 6 – Micrografia da atividade de desagregação do biofilme de *P. aeruginosa* clínica em superfícies de polipropileno. As imagens correspondem a um aumento de 1.000 vezes para cada amostra testada.53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Matrizes de percentuais de identidade das regiões ITS das linhagens CHAP-208 (A), CHAP-221 (B) e CHAP-243 (C) e suas espécies mais intimamente relacionadas. Os códigos dentro de parênteses representam os números das sequências ITS disponíveis no GenBank.42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.....	28
Tabela 2 – Leveduras <i>Papilotrema laurenti</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Meyerozyma</i> sp. e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , rendimento da amostra em gramas, frações extraídas e rendimento do extrato.....	46
Tabela 3 – Concentração de extrato que reduziu em 50% a viabilidade celular - CC50 (µg/mL) das linhagens A549, Vero e RAW com intervalo de confiança de 95% (ND: não determinada).....	47
Tabela 4 – Compostos fenólicos quantificados (em mg) ou detectados em 50 mg de extrato. ND: não determinado.	55
Tabela 5 – Análise semiquantitativa dos compostos orgânicos voláteis (VOC's) e terpenos presentes no meio de cultivo das linhagens de leveduras CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-02.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA	17
1.1.1	Câncer	17
1.1.2	Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Biomateriais	19
1.1.3	Resíduos de processos fermentativos e leveduras produtoras de compostos bioativos	22
1.1.4	Compostos bioativos intrínsecos a leveduras	25
1.2	OBJETIVO GERAL	27
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1	SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS DAS LEVEDURAS	28
2.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS LEVEDURAS.....	29
2.3	CULTIVO E PRESERVAÇÃO PRÉVIA DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS.....	30
2.4	PRODUÇÃO DE EXTRATOS COM A BIOMASSA CELULAR DAS LEVEDURAS.....	31
2.5	PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE.....	32
2.6	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM CÉLULAS ANIMAIS	32
2.6.1	Linhagens celulares	32
2.6.2	Meios de cultura	32
2.6.3	Determinação de espécies reativas ao oxigênio	33
2.6.4	Avaliação da citotoxicidade	33
2.6.5	Análise estatística	34
2.7	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM BIOFILME BACTERIANO	35
2.7.1	Linhagem bacteriana e condições de cultivo	35
2.7.2	Indução de biofilme em polipropileno e titânio	35
2.7.3	Análise quantitativa da redução de biofilme	36
2.7.4	Análise estatística	39
2.8	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	40

3.2	PRODUÇÃO DE EXTRATOS CELULARES.....	45
3.3	ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS CELULARES.....	46
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
3.5	REDUÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS BIOMÉDICOS	50
3.5.2	Titânio	50
3.5.2	Polipropileno	52
3.6	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS EXTRATOS CELULARES.....	54
3.7	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS SOBRENADANTES DOS CULTIVOS DAS LEVEDURAS.....	57
3.8	ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DAS LEVEDURAS TESTADAS.....	58
4	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM AND AGAINST YEASTS IN THE ONE HEALTH CONTEXT: A COMPREHENSIVE REVIEW	85
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO: BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INSIGHTS INTO FUNGUS-PLANT INTERACTIONS FOR ENHANCED SUSTAINABLE AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL PROCESSES.....	86
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: ANALYSIS OF THE HOLOCELLULOLYTIC AND FERMENTATIVE POTENTIALS OF YEASTS ISOLATED FROM THE GUT OF SPODOPTERA FRUGIPERDA LARVAE.....	87
	APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO: FUNGUS-BASED BIOHERBICIDES ON CIRCULAR ECONOMY	88
	APÊNDICE E – TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NOS ANAIS DO I COBBIND.....	89
	APÊNDICE F – CAPÍTULO PUBLICADO: BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE LEVEDURAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À SAÚDE.....	90
	ANEXO A – CERTIFICADO DE QUALIDADE DO CILINDRO DE TITÂNIO.....	91

1 INTRODUÇÃO

A riqueza da biodiversidade presente no território brasileiro representa cerca de 20% de todas as espécies do mundo, distribuídas entre seis biomas terrestres e três ecossistemas marinhos (Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima, 2023). Além das vidas macroscópicas que despertam nossa atenção, as espécies microbianas desempenham um papel fundamental nos diversos ambientes, incluindo plantas e animais, com impactos muitas vezes sutis (Giehl et al., 2023; Embrapa, 2020; Briones-Roblero et al., 2023; Albarello et al., 2023).

Dentre os microrganismos que habitam esses ambientes variados, os fungos leveduriformes se destacam pela sua ampla distribuição e presença (Álvarez-Pérez, 2022). Esta diversidade de habitats sugere que esses fungos unicelulares possam produzir uma gama variada de metabólitos bioativos, os quais podem ser aplicados em setores farmacêuticos, alimentícios e outras indústrias (Oliveira et al., 2022; Sinha et al., 2023).

A pesquisa voltada para o desenvolvimento de bioprodutos a partir de matérias-primas alternativas está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), abrangendo áreas como saúde, crescimento econômico sustentável, inovação e padrões de produção responsáveis. A busca por fontes naturais e alternativas de moléculas com capacidade de interagir com sistemas biológicos, promovendo benefícios à saúde humana e ambiental, tem se tornado uma prioridade (Ministério da Saúde, 2023; Organização Mundial da Saúde, 2023).

Os compostos bioativos representam um conjunto diversificado de substâncias capazes de interagir com processos biológicos, trazendo benefícios à saúde humana, incluindo medicamentos, nutracêuticos e produtos de cuidados pessoais (Sinha et al., 2023; Liu et al., 2016; Thyab Gddoa Al-sahlany et al., 2020; Sklirou et al., 2015). A pesquisa nessa área envolve diferentes abordagens, explorando fontes naturais como plantas, microrganismos, animais e fungos, além de métodos químicos e biotecnológicos (Sinha et al., 2023).

Apesar do potencial significativo dos compostos bioativos isolados de microrganismos, grande parte deles, particularmente os provenientes de leveduras, ainda permanece subutilizada, embora estudos recentes venham demonstrando possíveis aplicações (Doolam et al., 2024; Cian et al., 2022). Dada a predominância

de fármacos de origem biológica com ação antimicrobiana aprovados por órgãos reguladores, existe um espaço promissor para a expansão do conhecimento nessa área, especialmente considerando o combate a microrganismos patogênicos como vírus, fungos e bactérias (Newman; Cragg, 2020).

As leveduras, com seus altos rendimentos fermentativos e elevadas taxas de proliferação em larga escala (o que exige baixo tempo de processamento), apresentam-se como microrganismos atrativos para aplicações industriais, superando outros organismos microscópicos (Mata-Gómez et al., 2014). O seu uso é estabelecido na produção de alimentos, bebidas, bioetanol e até mesmo como probióticos (Alves et al., 2022; Mc Farland & Bernasconi, 1993). Apesar disso, a falta de conhecimento sobre as funções biológicas dos compostos bioativos microbianos limita seu uso (Liu et al., 2023; Dias et al., 2023), mesmo que haja relatos de eficácia antibacteriana e anticâncer em compostos derivados de leveduras (Fiedor e Burda, 2014; Sinha et al., 2023).

Dada a estreita relação das leveduras com processos fermentativos e sua biomassa residual nas indústrias, esse trabalho se propôs a avaliar *in vitro* as atividades antitumorais, antioxidantes e antibacterianas de extratos produzidos a partir dos metabólitos de leveduras selvagens e da indústria do etanol.

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

1.1.1 Câncer

A rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos é designada como câncer (OPAS, 2020). Essas enfermidades têm a capacidade de invadir tecidos e órgãos próximos ou distantes do local de origem, e são também conhecidas como neoplasias ou tumores malignos (WHO, 2022).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer está entre as principais causas de mortalidade global, tendo sido responsável por quase 10 milhões de óbitos no ano de 2020. Nesse contexto, alguns tipos de câncer destacaram-se por sua alta incidência. O câncer de mama liderou com cerca de 2,26 milhões de casos, seguido pelo câncer de pulmão com 2,21 milhões. Em terceiro

lugar, situam-se os cânceres de cólon e reto, registrando 1,93 milhões de casos, e, em quarto, o câncer de próstata, com aproximadamente 1,41 milhões de casos.

Quanto às taxas de mortalidade específicas, o câncer de pulmão ocupa uma posição proeminente, resultando em cerca de 18% das mortes relacionadas a câncer no mundo (1.796.144 óbitos) (OPAS, 2020). No Brasil o câncer de pulmão também está entre os mais prevalentes tanto em homens como em mulheres. Só no ano de 2020, essa doença foi responsável por 28.618 óbitos no país (INCA, 2022). A segunda forma mais prevalente é o câncer de cólon e reto, contribuindo com 9,4% das mortes (935.173 óbitos), seguido pelo câncer de fígado, responsável por 8,3% dos óbitos (830.180 óbitos). Em quarto lugar, o câncer de estômago responde por 7,7% dos óbitos causados por essa doença (768.793 óbitos) (INCA, 2023b).

A exposição ao tabaco é um dos maiores fatores de risco para o câncer de pulmão. Este hábito foi amplamente disseminado e intensificado durante a primeira guerra mundial e se perpetuou com grande força entre as décadas de 1960 e 1980. A partir de então, a taxa de incidência vem diminuindo, embora vários outros fatores estejam associados ao desenvolvimento do câncer. O consumo de álcool, a falta de exercícios físicos, uma dieta inadequada, a exposição à poluição do ar e a presença de infecções crônicas são considerados como riscos significativos para a manifestação dessa condição. Apesar de aproximadamente 90% das mortes por câncer de pulmão terem o tabaco como principal fator (INCA, 2023a), agentes químicos como asbesto, arsênico, berílio e cádmio também são considerados fatores carcinogênicos segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022).

Recentemente, um fator adicional tem contribuído para aumentar os casos de doenças pulmonares no mundo incluindo tumores: o uso crescente de cigarros eletrônicos (vape), especialmente entre os jovens (Tehrani et al., 2022). No Brasil, a venda desses fumígenos foi proibida pela ANVISA em 2009, por meio da RDC 46/2009. No entanto, o consumo continua a aumentar, e a falta de regulamentação em diversos países resulta em um descontrole na distribuição desses produtos. Além disso, os produtos químicos utilizados na vaporização são relatados como citotóxicos para as células epiteliais pulmonares humanas, além de aumentarem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) quando expostas ao aerossol do vape (Pinkston et al., 2020). Para avaliar o potencial citotóxico de substâncias que possam causar danos ou morte celular, é essencial conduzir ensaios *in vitro*; nesses ensaios, mede-se a viabilidade celular após a exposição a uma determinada substância a

concentrações conhecidas (Anil et al., 2023). Essa abordagem não apenas ajuda a compreender os possíveis danos causados por compostos nocivos aos quais estamos expostos, mas também contribui para otimizar candidatos a medicamentos tornando conhecida uma relação de concentração-resposta quando testada em células vivas.

Atualmente, as opções terapêuticas mais comuns para tumores malignos são a remoção por cirurgia (para casos menos avançados), a radioterapia (usando radiações de alta energia para destruir ou danificar as células cancerígenas) ou a quimioterapia (que faz o uso de medicamentos que visam eliminar ou controlar a proliferação das células cancerígenas). Esses tratamentos podem ser invasivos ou causar efeitos adversos severos para os pacientes e raramente garantem cura total dessa doença (Parvarish et al., 2019). Entretanto, em muitas situações ou estágios da neoplasia, a única alternativa é o paliativismo. Para além disso, ocorre uma crescente busca científica para atender esse tipo de demanda da sociedade, buscando alternativas sustentáveis em produtos naturais com potencial terapêutico, impulsionando a busca por compostos bioativos, que muitas vezes oferecem alternativas mais seguras e eficazes aos produtos tradicionais.

1.1.2 Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em Biomateriais

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa responsável por infecções agudas e crônicas em ambientes hospitalares (Jurado-Martín et al., 2021; Moradali et al., 2017). Esse bacilo é apontado como a maior causa de infecções contraídas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) na Europa (Lambert et al., 2011). Já nos EUA, são estimados que ocorram 51 mil casos por ano de infecção por essa bactéria em ambientes hospitalares (Eurosurveillance, 2013).

A patogenicidade da *P. aeruginosa* é reconhecida pela sua gama de fatores de virulência e mecanismos de resistência aos antibióticos conferidas ao genoma desse microrganismo. Além disso, possui também versatilidade metabólica e capacidade de adaptação a inúmeras condições, inclusive à resposta imune do hospedeiro (Riquelme et al., 2020; Maurice et al., 2018; Francis et al., 2017; Moradali et al., 2017).

A infecção persistente e irradicável por *P. aeruginosa* se adapta às vias aéreas, agravando a fibrose cística e seguindo com o indivíduo até o fim de sua vida (Döring et al., 2000). Ela pode estar associada a pneumonias com necessidade de ventilação mecânica; utilização de cateter central (cuja infecção atinge o fluxo sanguíneo);

infecções em cateter urinário e durante procedimentos cirúrgicos como transplantes; feridas infeccionadas cronicamente; otite média crônica (OMC); rinossinusite crônica (RSC); e, inflamação da córnea (Römling e Balsalobre, 2012; Cardo et al., 2004; Nathwani et al., 2014; Trubiano e Padiglione, 2015). Estudos americanos estimam que 13% das infecções têm como agente a *P. aeruginosa*, atribuídas a cepas multirresistentes a antibióticos (Eurosurveillance, 2013).

A *P. aeruginosa* foi elencada na categoria de prioridade máxima na lista de agentes patogênicos prioritários resistentes a antibióticos. Essa lista, elaborada pela Organização Mundial da Saúde, busca orientar e promover pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos para enfrentar a crescente resistência global aos antimicrobianos (WHO, 2024). Dentre os antibióticos mais utilizados atualmente, cepas de *P. aeruginosa* são relatadas como multirresistentes às classes de aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluoroquinolonas e carbapenêmicos (Eurosurveillance, 2013; Hancock e Speert, 2000; Hong et al., 2015; Lister et al., 2009; Poole, 2011; Potron et al., 2015; Strateva e Yordanov, 2009; Sun et al., 2014). Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos que a *P. aeruginosa* possui estão ligados a resistência intrínseca (Blair et al., 2015), adquirida e adaptativa (Lee et al., 2016), por meio de mutações e pelos plasmídeos (Blair et al., 2015).

Quando ocorre uma infecção bacteriana aguda, a interação patógeno-hospedeiro é nociva para as duas partes, pois uma diversidade de moléculas citotóxicas é produzida pelo patógeno acometendo os processos celulares do hospedeiro, ao mesmo tempo que as bactérias detectam sinalizações do sistema imunológico, como é o caso de espécies reativas de oxigênio, aumento da fagocitose e utilização de antibióticos (Furukawa et al., 2006; Turner et al., 2014; Moradali et al., 2017; Winstanley et al., 2016). O fenótipo da bactéria nesse caso manifesta-se com mais virulência. Em contrapartida, o sistema imune do infectado detecta com facilidade uma célula móvel por meio dos efeitos de movimentos, flagelos que estimulam a sinalização de respostas inflamatórias e fagocitose por macrófagos murinos ou humanos (Amiel et al., 2010). Por conta disso, a estratégia de diminuir virulência e assumir forma de vida sésil beneficia a manutenção da vida bacteriana, como é a estratégia de *P. aeruginosa*. Sendo assim, os patógenos ficam fixos em superfícies, formando complexos celulares onde são protegidos por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), formando assim os biofilmes, conferindo mais persistência e resistência a esse aglomerado bacteriano (Gellatly e Hancock, 2013;

MacDougall et al., 2005; Poole, 2012). Essa organização estrutural traz vantagens aos microrganismos inseridos nesse nicho, como aumento significativo de persistência à fagocitose das células do sistema imunológico do hospedeiro, ao estresse oxidativo, às limitações de nutrientes e oxigênio, ao acúmulo de produtos metabólicos remanescentes, a disputas entre espécies e à utilização de produtos bactericidas e bacteriostáticos convencionais (Leid, 2009; Olsen, 2015).

A prevalência de *P. aeruginosa* em ambientes de cuidados a saúde é bem estabelecida por conta da facilidade desse microrganismo colonizar tanto superfícies bióticas, incluindo os pacientes e profissionais da saúde, quanto superfícies abióticas, como equipamentos médicos implantáveis, sendo inclusive resistente a desinfecção (Russotto et al., 2015).

Dentro da matriz dos biofilmes bacterianos também são encontradas grandes reservas metabólicas nutritivas e de energia para que ocorra o crescimento microbiano. Nesse ambiente, ocorrem também relações interativas e comunicação entre células, protegendo-as de condições adversas (Flemming e Wingender, 2010). A composição da matriz de biofilmes de *P. aeruginosa* é dada em sua maior parte por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídios, dando origem, assim, a substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Cada um desses compostos contribui com diferentes funções, como a de adesão a superfícies, resistência a reações do sistema imune do hospedeiro, morfologia do biofilme e estratégias para manutenção e sobrevivência (Gellatly e Hancock, 2013; Ghafoor et al., 2011; Jennings et al., 2015; Stempel et al., 2013).

A formação de biofilmes principalmente por *P. aeruginosa* em ambientes abióticos como os biomateriais é um desafio a ser enfrentado com frequência em ambientes de tratamento a saúde, uma vez que os biomateriais são substâncias projetadas para interagir de forma harmônica com sistemas biológicos (Geetha et al., 2009; Griza et al., 2014; Williams, 1981). Esses biomateriais geralmente são utilizados para ortopedia, dispositivos cardiovasculares, implantes odontológicos, administração de medicamentos e engenharia de tecidos e pele (Brunette et al., 2001). A composição desses materiais biomédicos pode ser de polímeros, cerâmica e metais, como é o caso do titânio e suas ligas, que podem ser utilizados para implantes odontológicos e ortopédicos, articulações de quadril, dispositivos cardiovasculares, artroplastia e substituição óssea, implantes craniofaciais, maxilofaciais e dentários, instrumentos cirúrgicos, produtos de saúde ou próteses externas e internas (Jung, 2021; Marin et

al., 2023; Sarraf et al., 2021). Já o polipropileno (PP) é um material de baixo custo, resistente à chama, transparente e reciclável. É empregado em uma variedade de aplicações, incluindo a fabricação de suturas e próteses (Tappa et al., 2018). O polipropileno, juntamente com outras substâncias, é bem difundido nas áreas biomédicas (Ganjalinia et al., 2021; Khan et al., 2021; Raj et al., 2021; Ulu et al., 2020), podendo ser utilizado em malhas de reparo de hérnias (Heymann et al., 2019), andaime antibacteriano (Ulu et al., 2020), enxertos ósseos (Kalita et al., 2003) e reparação de defeitos ósseos (Alge et al., 2012; Chang et al., 2017).

A presença de microrganismos em biomateriais pode comprometer a eficácia dos dispositivos, podendo levar à necessidade de sua remoção ou substituição, aumentando assim o desconforto e os custos para os pacientes e para o sistema público de saúde. A complexidade desse tipo de colonização por biofilmes reside na capacidade desses de se adaptarem e resistirem aos tratamentos tradicionais gerando infecções persistentes e de difícil tratamento. Além do mais, as bactérias organizadas em biofilmes podem desenvolver resistência aos antibióticos, tornando-as mais difíceis de serem combatidas, enquanto a matriz extracelular atua como uma barreira física, dificultando a penetração de agentes antimicrobianos (Kilic et al., 2023; Gondil et al., 2023; Ansari et al., 2024).

Com o surgimento de diversos mecanismos moleculares que conferem resistência a várias classes de antibióticos, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas estão se tornando cada vez mais restritas. Simultaneamente, observa-se um aumento no número de incidências de infecções e na disseminação de cepas multirresistentes. Diante desse cenário, a pesquisa contínua se faz necessária para aprimorar a eficácia dos biomateriais e assegurar a biossegurança e durabilidade desses dispositivos implantáveis.

1.1.3 Resíduos de processos fermentativos e leveduras produtoras de compostos bioativos

Os resíduos agrícolas são gerados principalmente pelos países produtores de alimentos pelo mundo. O Brasil juntamente com a China, EUA e Índia são os maiores nessa cadeia produtiva (Koul et al., 2022; Sales, 2023). Esse tipo de material é composto por lignocelulose, fracionada principalmente em celulose, hemiceluloses e

lignina. Esses resíduos lignocelulósicos somam 8,2 bilhões de toneladas sem destino adequado (Singh et al., 2022); em alguns casos, a solução dada para os resíduos lignocelulósicos é a queima. Essa solução deixa claro a falta de gestão sustentável e gera poluição do ar, causando malefícios à saúde (Bhuvaneshwari et al., 2019). Além disso, a prática de queima frequente do resíduo em solo prejudica a sua fertilidade, reduzindo o carbono e o nitrogênio disponível e elimina a flora e a fauna locais (Porichha et al., 2021). Assim, alternativas de destinação mais dignas, diminuindo os impactos e adequando o destino e o reuso dos resíduos lignocelulósicos (principalmente os provenientes de processos agroindustriais) têm sido frequentemente avaliadas (Ojo, 2023).

Adicionalmente, cabe ressaltar que os setores produtivos de indústrias que empregam as leveduras, como é o caso das produtoras de cerveja, vinho e etanol, geram ao fim de seus processos um grande acúmulo de biomassa celular (De Oliveira et al., 2022). Tomando como exemplo apenas a produção brasileira de etanol, foram produzidos 35,4 bilhões litros do combustível no ano de 2023 segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2024). Para cada litro de etanol produzido, estima-se serem gerados 30 g de biomassa de levedura (Modesto et al., 2021). Sendo assim, o Brasil produz mais de 10 bilhões de quilos de biomassa residual desse microrganismo, que deve receber tratamento adequado e pode ser um subproduto com aproveitamento mais eficiente.

As leveduras são reconhecidamente biofábricas capazes de produzir muitas biomoléculas, inclusive quando cultivadas em substratos de baixo custo, como os resíduos lignocelulósicos (Singh et al., 2022; Adewuyi, 2022). É o caso de leveduras do gênero *Rhodotorula*, que têm despontado como boas produtoras de compostos antioxidantes. A *Rhodotorula toruloides*, por exemplo, mostrou-se capaz de produzir vários carotenoides, incluindo β -caroteno, γ -caroteno, torularrodina e toruleno a partir de meios contendo xilose, que é o principal componente da hemicelulose presente em substratos lignocelulósicos (Ribeiro et al., 2023). Já a *Rhodotorula babjevae*, além dos carotenoides acima mencionados, provou ser uma boa escolha também para a produção de ésteres poliálcool de ácidos graxos a partir de substratos semelhantes (Ayadi et al., 2024). De fato, leveduras com coloração rosa-alaranjado são frequentemente identificadas como produtoras de antioxidantes. Além de *Rhodotorula* spp., a *Rhodospiridium paludigenum* também apresentou compostos que reduzem as

espécies reativas de oxigênio, demonstrando sua capacidade de produzir carotenoides usando glicerol como única fonte de carbono (Sereti et al., 2024).

Com alguns ajustes metabólicos, a levedura *Yarrowia lipolytica*, conhecida por acumular alto teor de lipídios intracelularmente, também foi identificada como produtora de compostos com ações antioxidantes, como o ácido quinurênico, composto derivado da via catabólica do triptofano, e o ácido nervônico, com propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (Matusiewicz et al., 2023; Wróbel-Kwiatkowska et al., 2020; Liu et al., 2023; Zhao et al., 2023a).

As leveduras mais utilizadas como biofábricas atualmente são as do gênero *Saccharomyces*. Com a sua versatilidade adaptativa genética, a *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como plataforma para estabelecer a via biossintética do ácido carnósico, que também é relatado como um antioxidante (Ignea et al. 2016). Noutro estudo sobre este gênero, foi demonstrado que *Saccharomyces boulardii* e *Pichia fermentans* são boas acumuladoras de selênio, outro importante antioxidante (Hyršlova et al., 2024).

Os radicais livres são entidades altamente reativas e instáveis que possuem elétrons desemparelhados em átomos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre, formando as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e enxofre (ERE). As ERO incluem vários radicais, como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico (Carocho et al., 2013). Os compostos antioxidantes fornecem elétrons aos radicais livres (moléculas instáveis), evitando que biomoléculas importantes às células precisem doar seus próprios elétrons. Além disso, as próprias células produzem radicais livres durante suas funções normais. Portanto, os antioxidantes desempenham um papel importante na manutenção e prevenção de danos oxidativos intrínsecos e extrínsecos às células. Quando as ERO se acumulam em concentrações elevadas nas células, ocorre o estresse oxidativo, que pode causar danos significativos às membranas celulares, lipídios, proteínas e ao DNA (Jomova et al., 2023; Li et al., 2024; Zhao et al., 2023b). Esses danos são fatores contribuintes para várias doenças. A função dos antioxidantes é inibir a atividade das ERO, minimizando os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (Matusiewicz et al., 2022).

Os antioxidantes são descritos como grandes aliados em doenças neurodegenerativas, reduzindo o dano oxidativo ao tecido neural, contribuindo e prevenindo danos agravados nas doenças de Alzheimer, Parkinson e na doença do

neurônio motor (Houldsworth, 2024). Outras evidências mostram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na progressão de doenças cardiovasculares, como aterosclerose, insuficiência cardíaca, arritmia cardíaca e lesão de isquemia-reperfusão miocárdica. Assim, a suplementação antioxidante tem valor preventivo e/ou terapêutico na patologia com ensaios clínicos mostrando resultados positivos (Cammisotto et al., 2021). Considerando a relevância do uso de compostos antioxidantes, a viabilidade microbiológica de se empregar leveduras como biofábricas e a ampla disponibilidade de substratos, é essencial que a aplicação deste tipo de processo seja avaliada de maneira criteriosa e transparente.

1.1.4 Compostos bioativos intrínsecos a leveduras

Substâncias químicas presentes naturalmente em leveduras podem apresentar atividades biológicas com potenciais benefícios à saúde humana. Esses compostos podem incluir enzimas, proteínas, polissacarídeos, lipídios, vitaminas, minerais e outros metabólitos secundários (Demain e Martens, 2017).

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente empregada e examinada perante a fermentação industrial devido a seu alto desempenho em termos de taxa de proliferação, sua habilidade robusta de se adaptar à fermentação em grande escala, alta resistência às adversidades do ambiente industrial e à relativa facilidade de manipulação genética (Carsanba et al. 2021; Nandy e Srivastava 2018; Stalidzans e Dace 2021). O processo de fermentação viabiliza a síntese eficiente de moléculas naturais com elevado rendimento, causando um impacto ambiental reduzido e evitando a exploração de recursos naturais (Nandy e Srivastava 2018).

Dentre os subprodutos primários, destaca-se a biomassa de levedura residual, que também abriga compostos de interesse comercial devido às suas diversas atividades biológicas, como ação anti-hipertensiva, antioxidante e antimicrobiana (Oliveira et al. 2022a; San Martin et al. 2021). Conseqüentemente, a levedura residual adquire um valor substancial como resíduo da fermentação, sendo uma fonte preciosa de compostos biologicamente ativos que encontram aplicação em variados campos, incluindo suplementos alimentares e produtos cosméticos (Oliveira et al. 2022a).

Estes microrganismos, em grande parte aplicados em plantas industriais fermentativas e alimentícias, também possuem capacidade de sintetizar peptídeos,

polifenóis e terpenoides (Ganeva et al., 2020; Gómez-Mejía et al., 2019). A particularidade de produção de compostos bioativos está ligada às distintas rotas metabólicas de diferentes leveduras como *Saccharomyces bayanus*, produtora de melatonina (um antioxidante e hormônio importante para regulação do ciclo do sono) (Rodriguez-Naranjo et al., 2012); *Candida stellata*, produtora de indol (Arevalo-Villena et al., 2010); *S. cerevisiae*, da qual se obtém o tripeptídeo glutationa, com ação antioxidante, e uma toxina antifúngica (Hong et al., 2019; Orentaite et al., 2016; Santos et al., 2022); *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie*, produtora de riboflavina (um corante alimentar e suplemento) (Wang et al., 2008); *Candida sake*, produtora de compostos orgânicos voláteis como o 2-feniletanol, que age como antimicrobiano (Arrarte et al., 2017); *Hanseniaspora opuntiae*, produtora de quercetina-3-glicosídeo (flavonoide antiviral e antioxidante); *Issatchenkia terricola* e *Hanseniaspora opuntiae*, que produzem ácido cafeico (um ácido fenólico com ação antioxidante e anti-inflamatória) (de Lourdes et al., 2023); e, *Rhodotorula glutinis*, produtora de diferentes ácidos graxos de interesse comercial (Sineli et al., 2022).

Devido a diversas condições físicas e químicas externas de proliferação, como a temperatura de cultivo, a composição química do meio ou a fase de desenvolvimento, as células de leveduras apresentam uma ampla diversidade em relação ao tamanho, forma e cor da célula (Walker, 1998). Conseqüentemente, os compostos bioativos produzidos por suas vias metabólicas também são influenciados por esses fatores.

Dentre os compostos bioativos mais estudados estão os peptídeos antimicrobianos, que exibem atividade contra diversos patógenos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos. Além disso, leveduras podem produzir compostos antioxidantes que auxiliam na proteção contra danos oxidativos e envelhecimento celular (Tadioto et al., 2023a).

Outros compostos bioativos intrínsecos a leveduras também têm sido associados a benefícios nutricionais, como o aumento da biodisponibilidade de certos nutrientes, e propriedades probióticas, auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal, como é o caso da levedura *S. boulardii*. Essa levedura funciona como um antibacteriano contra cepas virulentas de *Escherichia coli* (Offei et al., 2019) e *Citrobacter rodentium* (Wu et al., 2008), e ajuda na proteção contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* (Ducluzeau e Bensaada, 1982). *Saccharomyces boulardii* produz grandes quantidades de ácido acético (Offei et al., 2019), o que

também pode contribuir com o controle desses patógenos humanos. Além disso, inflamações intestinais podem ser combatidas com a ajuda dessa levedura (Sen e Mansell, 2020).

A pressão mercadológica exercida sobre fontes tradicionais, como as plantas, na busca por moléculas bioativas torna a demanda incompatível com a oferta, desencadeando a exploração de ambientes de preservação e promovendo aumento do valor de mercado desses produtos. Sendo assim, as características das leveduras as tornam organismos de interesse em diversas áreas, incluindo alimentos funcionais, suplementos nutricionais, terapias médicas e aplicações em biotecnologia (Alves et al., 2022). A contínua investigação desses compostos promissores traz possibilidades para a melhoria da saúde humana e o avanço no desenvolvimento de soluções sustentáveis, seja empregando leveduras já utilizadas tradicionalmente ou aplicando leveduras não convencionais. Este estudo foi motivado pela habilidade das leveduras de utilizar uma ampla gama de substratos e produzir uma variedade de metabólitos que são de grande interesse para aplicações industriais e farmacológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito de diferentes extratos de leveduras em células tumorais, macrófagos e bactérias.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade biológica de extratos de células de leveduras selvagens e identificar os prováveis compostos bioativos produzidos por esses microrganismos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar taxonomicamente as linhagens de leveduras selvagens utilizadas para a produção dos extratos bioativos;
- Produzir extratos celulares a partir da biomassa de leveduras cultivadas em glicose e xilose;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos produzidos na linhagem celular tumoral A549, na linhagem não tumoral Vero e na linhagem monocítica (macrófagos) RAW;

- Avaliar o potencial dos extratos quanto à redução de espécies reativas de oxigênio na linhagem RAW;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Identificar e quantificar os compostos bioativos produzidos pelas leveduras.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS DAS LEVEDURAS

As linhagens de levedura utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção do Laboratório de Bioquímica de Leveduras do Campus Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul, onde permanecem depositadas. Foram escolhidas seis linhagens isoladas de diferentes substratos e ambientes, conforme sumarizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.

Código	Espécie	Ambiente de origem	Isolamento	Referência	
CHAP-158	<i>Papilotrema laurenti</i>	Intestino de lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i>	Grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Leveduras da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó	Albarelo et al., 2023	
CHAP-204	<i>Meyerozyma caribbica</i>				
CHAP-208	-	Flores de <i>Senna macranthera</i>		Este estudo	
CHAP-221	-				
CHAP-243	-				Abelha Mandaguari (<i>Scaptotrigona postica</i>)
PE-02	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura industrial	Fermentec		Tadioto et al. 2023b

Fonte: elaborado pela autora.

As linhagens CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221 e CHAP-243 tiveram seus DNA genômicos extraídos com o Kit Power Soil MOBIO conforme descrito por Green e Sambrook (2018). O DNA foi então submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores degenerados (ITS-1 e ITS-4), que amplificam o espaçador transcrito interno (ITS, da sigla em inglês) entre os genes que codificam os rRNAs 18S e 28S (White et al., 1990).

As reações de PCR foram compostas por 2,5 µL de tampão 10x, 1 µL de 50 mM de cloreto de magnésio, 0,2 µL de 100 mM de dNTPs (25 mM cada), 0,5 µL de cada iniciador (20 µM cada), 0,2 µL de Taq polimerase (5 U/µL, GoTaq® DNA Polymerase), 1 µL de DNA genômico e 19,6 µL de água ultrapura estéril, totalizando um volume final de 25 µL. O protocolo de PCR consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 2 minutos), finalizando com uma extensão a 72°C por 10 minutos.

Após a purificação do produto de PCR (Green e Sambrook, 2016), os ácidos nucleicos foram quantificados por espectrofotômetro (NanoVue®). Amostras contendo no mínimo 10 ng/µL de DNA amplificado foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen, Inc., utilizando o método de Sanger. Inicialmente, as sequências foram avaliadas utilizando o software Chromas (Chen, 2001) para verificar a qualidade do sequenciamento. Foram desconsideradas as sequências com Phred score médio inferior a 20. As sequências obtidas foram então depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), onde receberam os códigos PQ046709 (CHAP-158), PQ046787 (CHAP-204), PQ046786 (CHAP-208), PQ046650 (CHAP-221) e PQ046775 (CHAP-243).

2.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS LEVEDURAS

As sequências ITS das leveduras analisadas neste trabalho foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. Para isso, as sequências obtidas conforme descrito acima foram comparadas com o ITS de cepas padrão (*type material*) já presentes no GenBank do NCBI usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) considerando uma cobertura de pelo menos 95% (*Query Cover* ≥ 95%). Na construção da árvore, foram adicionadas as dez sequências com maior identidade em relação às leveduras do presente estudo. O mesmo foi feito a partir do ITS da linhagem *S. cerevisiae* PE-2, que já teve seu genoma sequenciado (Argueso et al. 2009). Nesse caso, porém, o BLAST foi realizado a partir da sequência entre os nucleotídeos 442862 e 443630 (que corresponde ao seu ITS) do cromossomo XII desta levedura, disponível no GenBank sob o código LR999883.

Subsequentemente, todas as sequências ITS foram alinhadas com a ferramenta *Clustal Omega Multiple Sequence Alignment* (Clustal O, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e o alinhamento resultante foi curado por Gblocks na plataforma Phylogeny.fr (Castresana 2000; Dereeper et al. 2008, 2010 - <http://www.phylogeny.fr>), considerando parâmetros pouco estridentes (permitindo blocos finais menores, posições de lacuna dentro dos blocos finais e posições de flaqueamento menos estridentes). O alinhamento curado foi então usado para gerar a árvore filogenética usando critério de informação Bayesiano (BIC) em modelo de seleção *Smart* (Lefort et al. 2017) implementado no ambiente PhyML (Guindon et al. 2010 – <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml-sms>), com uma análise bootstrap de 1000 réplicas. Para formatar a árvore filogenética, utilizamos a ferramenta online Interactive Tree of Life (iTOL, <https://itol.embl.de>) (Letunic e Bork 2021).

2.3 CULTIVO E PRESERVAÇÃO PRÉVIA DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho foram escolhidas em função dos seguintes fatores:

- Capacidade de sobrevivência em ambiente natural, como em flores e na superfície ou interior de insetos;
- Isolamento de substratos e ambientes distintos, com vistas à análise de representantes de diferentes grupos taxonômicos;
- Características fenotípicas variadas — uma das leveduras escolhidas produz pigmentos entre rosa e laranja (CHAP-208) enquanto outra produz pigmentos marrons a pretos (CHAP-221);
- Capacidade de metabolizar os dois açúcares majoritariamente presentes em hidrolisados lignocelulósicos — é o caso das linhagens CHAP-158 e CHAP-204, conforme publicamos em artigo prévio (Albarello et al., 2023);
- Tolerância a fatores de estresse do ambiente industrial — por isso a escolha da linhagem industrial *S. cerevisiae* PE-2, amplamente utilizada na produção de etanol combustível no Brasil (Basso et al., 2008).

As leveduras foram inicialmente pré-cultivadas em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 5 mL de YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por 48 horas, com agitação de 200 rpm, a 30°C. Em seguida, as leveduras

do pré-cultivo foram inoculadas na proporção de 1/100 em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio de cultura YPDxi (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de xilose) e incubadas a uma temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm por aproximadamente 48 h, ou até chegar a uma concentração de 20 g/L (de células).

A separação das células do meio de cultura líquido foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm utilizando centrífuga modelo 5804R (Eppendorf) durante 5 min a 4°C. As células foram submetidas a dois ciclos de lavagem com água destilada autoclavada a 4°C. Em seguida, as biomassas celulares foram pesadas e congeladas a uma temperatura de -6°C, sem a adição de criopreservantes para favorecer a lise celular da biomassa das leveduras.

2.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS COM A BIOMASSA CELULAR DAS LEVEDURAS

Para extração dos compostos intracelulares das leveduras foi realizada uma extração exaustiva onde a biomassa das células foi suspensa em 10 mL de metanol-água (80:20 v/v), e essa mistura foi mantida em banho ultrassônico por 1 hora. Em seguida, em um funil de separação, a suspensão celular foi misturada com os solventes orgânicos na proporção de 1:1 (v/v).

Os solventes orgânicos utilizados para extração de compostos bioativos foram, alternadamente, hexano, acetato de etila e butanol. O solvente foi homogeneizado com a biomassa celular e em seguida foi mantida em repouso até que as fases da extração líquido-líquido fossem observadas e fosse possível a separação por escoamento. Em seguida foram filtradas as amostras com o auxílio de um funil com algodão compactado. O resíduo (fase aquosa) também foi utilizado como fracionado.

As frações extraídas foram adicionadas em balões de fundo redondo, anexadas em rotaevaporador sob pressão reduzida e vaporizadas conforme o ponto de ebulição de cada solvente utilizado. Após a vaporização total dos solventes, as amostras foram congeladas em freezer e mantidas congeladas com auxílio de nitrogênio líquido para a liofilização até a secagem completa dos extratos. Por fim, as amostras foram pesadas, acondicionadas em frascos e mantidas em dessecador até o preparo das soluções de estoque.

2.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE

Os extratos liofilizados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) obtendo concentrações conhecidas, resultando nas soluções de estoque.

Nos ensaios biológicos realizados, as soluções estoques foram diluídas em meio de cultura apropriado para cada linhagem celular. Nos ensaios, as quantidades de DMSO utilizadas não ultrapassaram 1% nas maiores concentrações de extratos utilizadas, não ocorrendo influência do solvente nos ensaios.

2.6 ENSAIOS *IN VITRO* COM CÉLULAS ANIMAIS

2.6.1 Linhagens celulares

Para os ensaios de determinação da citotoxicidade dos extratos foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: A549 (ATCC CCL-185™), derivada de um adenocarcinoma de pulmão humano; Vero (ATCC CCL-81™), derivada de fibroblasto de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*); e, RAW 264.7, derivada de macrófagos murinos. As células A549 e Vero foram adquiridas do American Type Culture Collection - ATCC® e a linhagem RAW 264.7 foi cedida por Walter Atwood, Brown University, Providence, Rhode Island, RI. Esta última linhagem também foi utilizada para os ensaios de espécies reativas de oxigênio.

2.6.2 Meios de cultura

O meio de cultivo utilizado para as linhagens celulares A549 e Vero foi MEM (Minimal Essential Medium – Eagle) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para a linhagem celular RAW 264.7 foi utilizado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram incubadas a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂ em estufa.

As subculturas celulares foram estabelecidas com o emprego da enzima proteolítica dissociadora tripsina preparada em uma solução contendo EDTA 1:250 (Sigma®). As linhagens celulares foram avaliadas rotineiramente para detecção da presença de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e micoplasmas.

2.6.3 Determinação de espécies reativas ao oxigênio

A atividade antioxidante dos extratos intracelulares foi mensurada por meio do protocolo adaptado de Ng e Ooi (2021), o qual se baseia na detecção indireta de espécies reativas de oxigênio por meio da sonda 2,7-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies). Para isso, células da linhagem RAW 264.7 foram semeadas em uma concentração de 4×10^4 células/mL em microplacas de 96 cavidades pretas de fundo transparente revestidas com matriz de colágeno. As células foram aclimatadas em temperatura de 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂ em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) isento de vermelho fenol. Após a confluência, as células foram tratadas na placa com concentrações de extratos de 50 µg/mL e em seguida novamente incubadas por um período de 24 horas. Como controle, foi utilizado 100 µM de peróxido de hidrogênio, o qual foi adicionado 1 hora antes do fim do tratamento. Além disso, também foram mantidas cavidades sem nenhum tipo de tratamento para controle celular. Posteriormente, o meio de cultivo foi removido e substituído por 30 µM da sonda em meio DMEM previamente aquecido a 37°C. Após um período de 30 minutos, a sonda foi removida e substituída por 100 µL de DMEM, a placa foi protegida de incidência luminosa e a aquisição dos valores de espectroscopia de fluorescência foi realizada na Multileitora Infinite M200 (Tecan) empregando um comprimento de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 522 nm. A normalização dos valores de fluorescência foi realizada por meio da determinação de densidade celular. Em seguida as placas contendo as células seguiram para a avaliação em ensaio colorimétrico com sulforrodamina B descrita no item 2.6.4.

2.6.4 Avaliação da citotoxicidade

Para determinação da citotoxicidade dos extratos foi avaliada a viabilidade celular com o ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), conforme descrito por Vichai; Kirtikara (2006) e padronizado por Silva (2009) no Laboratório de Virologia Aplicada. Este ensaio quantificou a redução da viabilidade celular causada pelos extratos aplicados em placas de 96 cavidades ($1,0 \times 10^4$ células por 100 µL para A549, $2,5 \times 10^4$ células por 100 µL para Vero e $4,0 \times 10^5$ células por 100 µL para RAW para cada cavidade). Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas para a

confluência celular. Para a determinação da citotoxicidade dos extratos produzidos, foram testadas diferentes concentrações (diluições 1:2). Após o período de tratamento, as células foram fixadas sem a remoção do sobrenadante, adicionando-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% em cada cavidade e a placa foi incubada por 1 hora a 4°C. Em seguida, foram lavadas cuidadosamente com água destilada por três vezes e mantidas por 24 horas para secagem. As proteínas das células fixadas foram coradas com 100 µL de SRB em solução contendo ácido acético (0,057% p/v) e mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. O excesso de corante não ligado às proteínas foi descartado em três lavagens com uma solução de ácido acético a 1% (v/v). Em seguida, foi removido o corante com 100 µL de tampão Tris-Base 10 mM (pH 10,5) em incubação com agitação leve por 10 minutos em temperatura ambiente para dissolução total. Logo após, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectra MD2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 510 nm.

Os valores de absorbâncias obtidos em cada poço contendo o extrato foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle celular, onde 100% representa a viabilidade total das células. Isso foi realizado utilizando a Equação 1:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{DO_{510nm} Extrato - teste \times 100}{DO_{510nm} Controle\ celular} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, DO_{510nm} representa a absorbância quantificada em densidade óptica.

Os gráficos foram plotados e, por meio de análise de regressão não-linear, foi possível calcular a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular (CC_{50}). Os ensaios foram compostos pela média das triplicatas independentes com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

2.6.5 Análise estatística

Os cálculos de CC_{50} foram conduzidos por meio da aplicação de análise de regressão não linear, usando curvas que relacionam concentração com efeito. Para os ensaios de determinação de espécies reativas de oxigênio, foram utilizados análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Teste de Tukey). Cada

experimento foi realizado em triplicata e apresentado junto com o Intervalo de Confiança de 95% (IC95%). Os programas utilizados para realizar as análises foram o GraphPad Prism 8 e o Excel.

2.7 ENSAIOS IN VITRO COM BIOFILME BACTERIANO

2.7.1 Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A bactéria utilizada foi a *Pseudomonas aeruginosa*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) do Hospital Universitário (HU) Polydoro Emani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A linhagem é proveniente de isolados clínicos de tecidos de pacientes em caldo de cultivo de tioglicolato. Os testes foram padronizados em linhagem padrão de *P. aeruginosa* (ATCC-27853), sabidamente produtora de biofilme. A cepa clínica de *P. aeruginosa* foi identificada por oxidase e ágar cetrimide com incubação a 37 °C e 42 °C, e confirmada em sistema Vietek e série bioquímica. A linhagem bacteriana utilizada é armazenada e mantida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Florianópolis.

O cultivo da *P. aeruginosa* clínica foi realizado em meio BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi). A preparação foi realizada conforme recomendação do fabricante. Os inóculos bacterianos foram realizados com um pequeno número de colônias bacterianas (5 Log de UFC.mL⁻¹) mantidas em estoques, congeladas em meio BHI. Um volume de 1 mL dessa suspensão bacteriana armazenada foi transferido para um Erlenmeyer estéril contendo 99 mL de meio BHI. Esse inóculo foi mantido em incubação de estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas para posterior indução do biofilme em biomateriais, descrita no item 2.7.2.

2.7.2 Indução de biofilme em polipropileno e titânio

Para a indução do biofilme de *P. aeruginosa* foi utilizado adaptação do estudo de Da Rosa Freitas; Sand e Simonetti (2010). Foram utilizados dois tipos de biomateriais: cilindros em titânio e microplacas em polipropileno (PP). Em microplacas

de 24 cavidades, foram adicionados 20 μL do inóculo de *P. aeruginosa* juntamente com 980 μL de meio BHI. Os cilindros de titânio, previamente esterilizados, foram imergidos em cada cavidade da microplaca destinada a esse ensaio. Assim, as placas contendo o titânio e as placas de polipropileno foram incubadas durante 4 dias em estufa a 37 °C. Nas mesmas condições foram incubadas microplacas de controle, apenas com caldo BHI sem adição de inóculo bacteriano com os mesmos parâmetros dos ensaios. A cada 48 horas as células planctônicas foram removidas pela lavagem com tampão de fosfato salino (PBS) e os meios de cultivo trocados. Com o biofilme induzido no quarto dia, foram adicionados os tratamentos com os extratos solubilizados em água ultrapura na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Da mesma forma, as cavidades selecionadas para os controles receberam apenas água. Após 24 horas, foram realizadas as análises quantitativas da redução de biofilme como descritas no item 2.7.3. Para cada condição testada, foram realizados ensaios em triplicatas independentes.

Os cilindros de titânio de 5 mm de diâmetro e 3 mm de espessura utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários (CEPID) localizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A obtenção dos cilindros foi realizada pelo corte de barras de titânio puro GR4, com certificado de qualidade nº 0277/2019 conforme ISO 13485 e ISO 9001 (Anexo A - Certificado de qualidade do cilindro de titânio).

2.7.3 Análise quantitativa da redução de biofilme

2.7.3.1 Contagem de células

A contagem de células bacterianas viáveis foi realizada apenas para os ensaios utilizando os cilindros de titânio. Esse ensaio foi feito por meio do plaqueamento da suspensão bacteriana, utilizando a técnica de spread-plate. Este processo envolveu o espalhamento de 5 μL da suspensão bacteriana, que havia sido previamente tratada com extratos, sobre a superfície de meio de cultura (BHI-Agar) contido em uma placa de Petri. A semeadura foi realizada com o auxílio de uma alça de Drigalski, garantindo a distribuição uniforme da suspensão por toda a superfície do meio. Após, a placa foi incubada em uma estufa bacteriológica a 37°C por um período

de 18 horas. A quantificação das células viáveis foi então realizada através da contagem de colônias, considerando-se um intervalo ideal de 30 a 300 colônias por placa para uma contagem precisa.

2.7.3.2 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Para a análise visual em cilindros de titânio, tanto os com biofilme quanto os controles, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Essa investigação foi possível pela gentil colaboração do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após a realização dos tratamentos com extratos, os cilindros em titânio foram preparados conforme a adaptação do protocolo de De Castro (2002). Para fixar o biofilme, os cilindros foram removidos da microplaca e lavados com tampão de fosfato salino (PBS) estéril durante 1 minuto; logo após, foi fixado o biofilme em glutaraldeído (2,5%) com duração de no mínimo 12 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação dos biofilmes nos cilindros com imersão em álcool em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), mantendo 30 minutos em cada concentração. Após, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio (1%). Depois de 1 hora de imersão, foi realizada a secagem química em solução de hexametildissilazano (HMDS) e submetido a metalização em ouro em equipamento Metalizador Sputter Coater Bal-Tec SDC 050. Para isso, os cilindros foram imobilizados na base de alumínio e o equipamento de metalização realizou a pulverização durante 2 minutos formando uma camada fina de ouro com 10 nm. Os cilindros em titânio metalizados foram novamente fixados com fita carbono em strubs metálicos para posteriormente serem observados e as imagens registradas no MEV.

2.7.3.3 *Microscopia de fluorescência*

Para a avaliação quantitativa da redução de biofilme bacteriano em superfícies de polipropileno (PP), tanto nos tratamentos quanto nos controles, foi utilizado o Microscópio invertido IX83 (OLYMPUS). Essa investigação foi possível pela gentil colaboração do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após a realização dos tratamentos

com extratos, as cavidades de polipropileno e os controles foram preparados conforme a adaptação do protocolo de Freshney (2015).

As cavidades foram cuidadosamente lavadas duas vezes com tampão de fosfato salino (PBS). Para fixar o biofilme, foram adicionados 500 µL de uma solução de metanol e ácido acético glacial na proporção 3:1 (v/v) diluído em PBS na proporção 1:1 (v/v) sobre as placas, que foram então mantidas em refrigeração por 10 minutos. Em seguida foi removida a solução de fixação e o biofilme foi lavado novamente por duas vezes com PBS. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do marcador fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) em uma solução de 1 µg/mL em água deionizada. O biofilme foi protegido da iluminação e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, o excesso do marcador foi removido e ocorreram mais duas lavagens com PBS no biofilme fixado e corado. Ainda com as placas protegidas da iluminação, foram realizadas as leituras no Microscópio invertido de fluorescência com excitação de 358 nm e emissão de 461 nm.

2.7.3.4 *Quantificação das micrografias de fluorescência*

Para a avaliação quantitativa da redução de biofilme bacteriano em superfície de polipropileno, foi utilizado o programa ImageJ© juntamente com as micrografias realizadas no microscópio de fluorescência. Nesta análise foram utilizadas duas réplicas em cada placa, onde ocorreram triplicatas independentes, totalizando assim mais 102 imagens. As imagens foram padronizadas com a escala de 1.000 vezes; com isso, as porcentagens de área infectada por biofilme e área apenas do biomaterial foram definidas e as imagens salvas em formato TIFF (Tag Image File Format). O cálculo de redução percentual de biofilme foi realizado levando em conta as porcentagens encontradas, como mostra a Equação 2:

$$\text{Redução de biofilme (\%)} = \text{Méd. não trat. (\%)} - \text{Méd. Trat. (\%)} - \text{Méd. s/ biofilme (\%)} \\ \text{(Equação 2)}$$

Onde, a redução de biofilme em porcentagem é dada pela subtração das médias não tratadas, após os tratamentos com extrato e dos biomateriais limpos (sem receber tratamento nem biofilme).

2.7.4 Análise estatística

Os cálculos de redução de biofilme foram conduzidos por meio da aplicação de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Teste de Tukey). Cada experimento foi apresentado junto com o intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os programas utilizados para realizar as análises foram o GraphPad Prism 8 e o Excel.

2.8 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os extratos oriundos da extração líquido-líquido da biomassa de leveduras foram identificados e quantificados na central analítica do Campus Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo LCMS-2020 (Shimadzu). As amostras liofilizadas foram solubilizadas em álcool metílico, em seguida filtradas em membranas de 0.45 µm de porosidade e então transferidas para vials cromatográficos para injeção em uma coluna capilar Shim-pack GISS – C18 (4,6mm x 150mm x 3µm) para compostos fenólicos. Como fase móvel, foi utilizada uma solução 0,3% de ácido fórmico em 99,7% de metanol, com vazão de 0,4 mL/min. O detector utilizado foi o espectrômetro de massas. A curva padrão de cada composto fenólico foi calibrada utilizando cinco pontos para cada composto, variando de 1 a 10 mg/L. Os padrões utilizados foram a quercetina, miricetina, kaempferol, ácido caféico, epicatequina, ácido p-cumárico, pirocatequina, ácido siríngico, flavona, ácido gálico e epigallocatequina. As vazões médias de cada composto foram, respectivamente, 0,047; 0,093; 0,015; 0,022; 0,021; 0,019; 0,425; 1,049; 0,025; 0,210 e 0,033 mL/min. Os compostos fenólicos foram selecionados a partir de buscas bibliográficas prévias.

Além dos compostos presentes nos extratos, foram analisados os compostos presentes no meio de cultivo utilizado para a propagação das leveduras. Para isso, foi realizada uma extração líquido-líquido utilizando diclorometano, conforme descrito por Roque et al. (2019). Em seguida, as amostras foram filtradas e injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010Ultra (Shimadzu). Para isso, injetou-se uma quantidade de 2 µL de amostra em uma coluna capilar NST05ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com fase móvel de gás hélio, a um fluxo total de 14 mL/min. O injetor estava a 150 °C, com uma divisão

de 1:10. A programação de temperatura do forno começou a 100 °C por 6 minutos, seguida por um aumento de 100°C a 150°C a uma taxa de 4 °C/min e, posteriormente, de 150°C a 280°C a uma taxa de 8 °C/min, mantendo-se a 280°C por 40 minutos. O espectrômetro de massas operou com a fonte de ionização a 200°C e a interface a 280°C, no modo de escaneamento (m/z) de 35 a 500. A análise do espectro de massas utilizou a biblioteca NIST08s do próprio equipamento.

Em cada cromatograma resultante das análises em GC, foram selecionados os 15 maiores picos com índices de similaridade (IS) superiores a 90% (cada IS é determinado comparando o composto detectado e seu composto mais semelhante disponível na biblioteca do espectrômetro de massa). A mesma análise também foi realizada com diclorometano puro e com cada meio de cultura antes da inoculação. Assim, foi possível discriminar os compostos naturalmente presentes no solvente e no meio daqueles provenientes do metabolismo das leveduras. A produção dos compostos foi realizada de forma semiquantitativa através das áreas de cada pico, o que representa a abundância relativa de cada composto em relação aos demais, conforme descrito por Di Francesco et al. (2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Dentro de ecossistemas naturais ocorrem interações complexas e harmônicas entre diversas espécies. As leveduras, por serem amplamente disseminadas, assumem um papel de destaque, desempenhando funções indispensáveis tanto na fermentação quanto na decomposição de matéria orgânica, exercendo e recebendo influência sobre as trajetórias evolutivas de organismos superiores (Giehl et al. 2023; Fenner et al. 2022; Tadioto et al. 2023a).

Nas flores de angiospermas, as leveduras assumem uma função primordial na fermentação do néctar rico em açúcares, gerando compostos orgânicos voláteis que atraem insetos até as flores. As leveduras presentes no néctar também se tornam uma fonte nutricional essencial para esses insetos. Esta ação dinâmica aumenta a variabilidade genética das plantas, conferindo-lhes uma maior adaptabilidade às mudanças no ambiente. É importante destacar que, além do papel na polinização, os compostos produzidos por leveduras associadas a plantas e insetos polinizadores

podem apresentar atividade biológica de interesse biotecnológico (Becher et al., 2018; Fenner et al., 2022).

Das leveduras utilizadas neste estudo, duas são provenientes de nectários de angiospermas (especificamente de flores de *Senna macranthera*) e uma foi isolada de uma abelha nativa sem ferrão (*Scaptotrigona postica*, popularmente conhecida como Mandaguari). Outras duas linhagens são oriundas de lagartas *Spodoptera frugiperda*, que se alimentam de folhas, e uma foi obtida da produção brasileira de etanol combustível (vide Tabela 1). Essa busca em diferentes substratos e ambientes tinha como intenção a avaliação de leveduras de nichos ecológicos distintos (e, portanto, de comportamentos fisiológicos variados) e que representassem grupos taxonômicos diversos. Além disso, foram considerados também características fenotípicas previamente conhecidas dessas linhagens. As cepas *P. laurentii* CHAP-158 e *M. caribbica* CHAP-204, por exemplo, foram previamente identificadas como boas produtoras de etanol e xilitol a partir de glicose e xilose (Albarello et al., 2023). A levedura *S. cerevisiae* PE-2 está entre as mais empregadas pela indústria, sendo reconhecida pela sua elevada tolerância aos fatores de estresse encontrados em dornas de fermentação (Basso et al., 2008). Por fim, as outras três linhagens, embora não tenham sido caracterizadas em trabalhos já publicados, foram escolhidas por sua pigmentação (as colônias da CHAP-208 apresentam coloração entre rosa e laranja, e as da CHAP-221, entre o marrom e o preto) ou capacidade de consumo de xilose (CHAP-243).

No início deste trabalho, portanto, três das linhagens utilizadas (CHAP-158, CHAP-204 e PE-2) já estavam identificadas em nível de espécie. As cepas CHAP-208, CHAP-221 e CHAP-243, em contrapartida, ainda careciam de identificação. Em razão disso, suas regiões ITS foram sequenciadas e comparadas a de cepas padrão disponíveis no GenBank do NCBI. As sequências que apresentaram maior similaridade foram então alinhadas, gerando as matrizes de identidade apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Matrizes de percentuais de identidade das regiões ITS das linhagens CHAP-208 (A), CHAP-221 (B) e CHAP-243 (C) e suas espécies mais intimamente relacionadas. Os códigos dentro de parênteses representam os números das sequências ITS disponíveis no GenBank.

A	1:	2:	3:	4:	5:
1: CHAP-208	-	99,78%	99,56%	99,33%	99,33%
2: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NR073296)	99,78%	-	99,78%	99,56%	99,11%
3: <i>Rhodotorula alborubescens</i> (NR153197)	99,56%	99,78%	-	99,33%	98,89%
4: <i>Rhodotorula mackillarae</i> (NR189977)	99,33%	99,56%	99,33%	-	99,11%
5: <i>Rhodotorula frigidialcoholis</i> (NR186947)	99,33%	99,11%	98,89%	99,11%	-
B	1:	2:	3:	4:	5:
1: CHAP-221	-	100,00%	99,80%	99,39%	98,98%
2: <i>Aureobasidium leucospermi</i> (KT693727)	100,00%	-	99,79%	99,38%	98,96%
3: <i>Aureobasidium khasianum</i> (MH188305)	99,80%	99,79%	-	99,18%	98,77%
4: <i>Aureobasidium xishuangbannaense</i> (NR189879)	99,39%	99,38%	99,18%	-	98,57%
5: <i>Aureobasidium insectorum</i> (NR189919)	98,98%	98,96%	98,77%	98,57%	-
C	1:	2:	3:	4:	5:
1: CHAP-243	-	100,00%	99,81%	99,03%	98,05%
2: <i>Meyerozyma carpophila</i> (MK394110)	100,00%	-	99,82%	99,09%	98,18%
3: <i>Meyerozyma caribbica</i> (MH545919)	99,81%	99,82%	-	99,27%	98,36%
4: <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918)	99,03%	99,09%	99,27%	-	98,00%
5: <i>Meyerozyma smithsonii</i> (MK394111)	98,05%	98,18%	98,36%	98,00%	-

Fonte: elaborado pela autora.

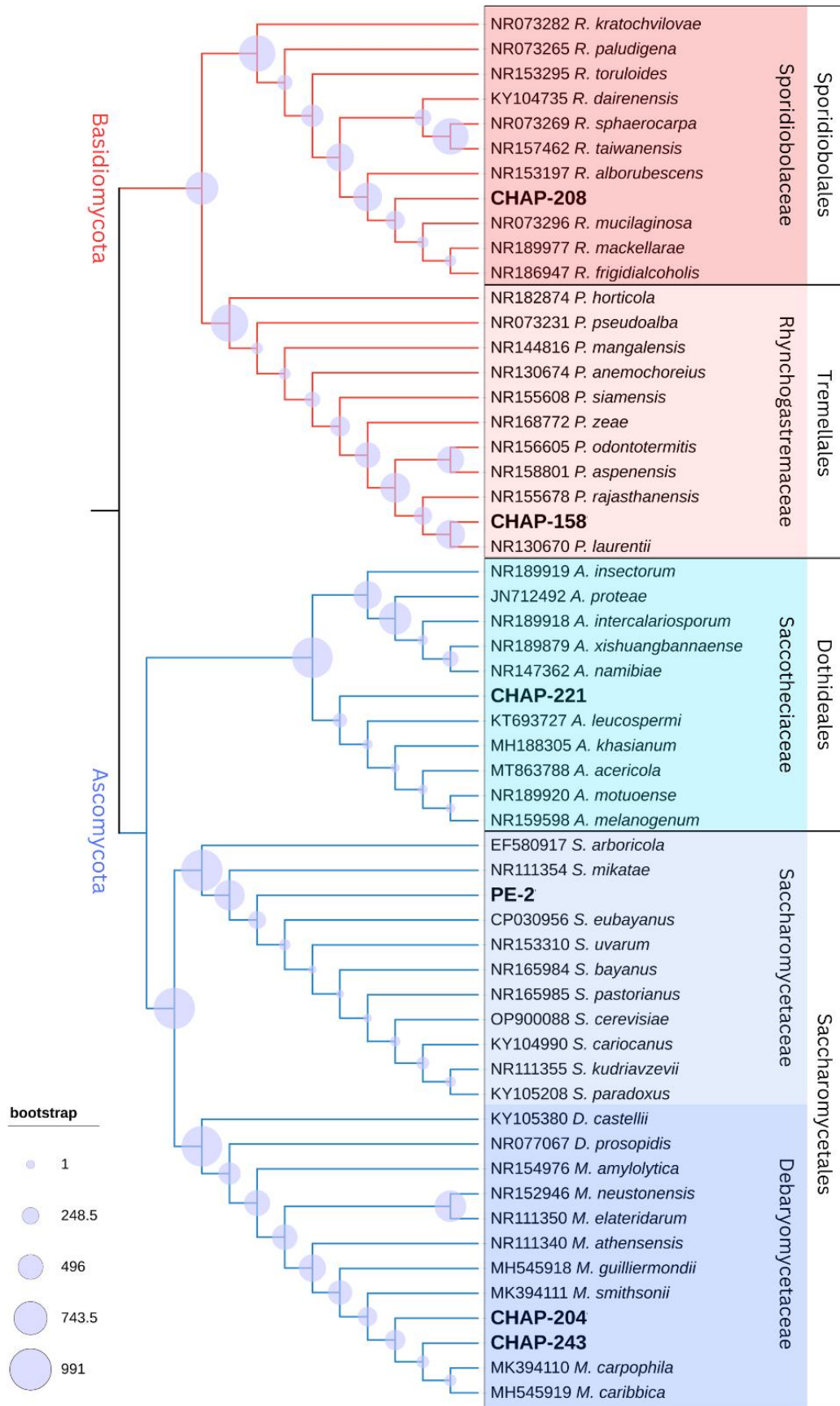
A partir dessas matrizes, as linhagens CHAP-208, CHAP-221 e CHAP-243 foram, respectivamente, consideradas como representantes dos gêneros *Rhodotorula*, *Aureobasidium* e *Meyerozyma*. O isolado CHAP-208 apresentou 99,78% de identidade com a cepa tipo de *Rhodotorula mucilaginosa* e 99,56% com *Rhodotorula alborubescens*. As leveduras *Rhodotorula* spp. são reconhecidas pela produção de carotenoides. São também consideradas oleaginosas, caracterizadas pelo fato de acumularem até 50% de seu peso seco na forma de lipídeos (Hof, 2019; Xue et al., 2018). A linhagem CHAP-221, por sua vez, apresentou 100% de identidade com *Aureobasidium leucospermi* e 99,80% com *Aureobasidium khasianum*. Leveduras desse gênero formam hifas pretas quando a colônia envelhece. Elas podem produzir uma gama de enzimas e produtos que são úteis na indústria e são uma fonte comprovada de proteína unicelular ou microbiana que corresponde a microrganismos unicelulares comestíveis (*single-cell protein*) (Deshpande et al., 1992). Por fim, o ITS da CHAP-243 apresentou 100% de identidade com o ITS da cepa tipo de *Meyerozyma carpophila* e 99,81% com *Meyerozyma caribbica*.

Leveduras desse gênero são descritas como produtoras de compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Iñiguez-Moreno et al., 2020) e do oligossacarídeo alginato, um composto bioativo (Wang et al., 2021). Haja vista o elevado grau de identidade dos ITS sequenciados com os de pelo menos outras duas espécies, não atribuímos o epíteto específico às leveduras. Elas ficaram, então, aqui registradas como *Rhodotorula* sp. CHAP-208, *Aureobasidium* sp. CHAP-221 e *Meyerozyma* sp. CHAP-243. Trabalhos futuros poderão sequenciar os domínios D1/D2 do rRNA 28S dessas leveduras para elucidar a identificação em nível de espécie.

No intuito de ilustrar a diversidade filogenética das leveduras escolhidas para este trabalho, as regiões ITS das linhagens CHAP-158 e CHAP-204 também foram sequenciadas. Adicionalmente, a sequência correspondente da cepa PE-2 foi buscada no GenBank, haja vista ter esta levedura seu genoma sequenciado (Argueso et al. 2009). Analisadas em conjunto, as sequências ITS das seis leveduras objeto deste estudo somadas a outras dez de maior identidade (em relação a cada uma delas) deram origem à árvore filogenética apresentada na Figura 1. O cladograma agrupa as linhagens em cinco diferentes famílias pertencentes a quatro ordens distintas dentro de dois *fila*, demonstrando relevante representatividade de grupos fúngicos leveduriformes no presente trabalho.

Figura 1 – Cladograma construído a partir das sequências ITS das linhagens objeto deste estudo (CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-2) e das cepas padrão das espécies mais intimamente relacionadas. Abreviações dos gêneros: *R.*, *Rhodotorula*; *P.*, *Papiliotrema*; *A.*, *Aureobasidium*; *S.*, *Saccharomyces*; *D.*, *Debaryomyces*; e, *M.*, *Meyerozyma*. Os códigos à esquerda do nome das espécies representam os números de depósito no GenBank. Os ramos em azul pertencem ao Filum Ascomycota e em vermelho, ao Filum Basidiomycota. No cladograma, também estão demarcados os clados que pertencem às famílias Sporidiobolaceae, Rhynchogastremaceae, Saccotheciaceae, Saccharomycetaceae e Debaryomycetaceae, e às ordens Sporidiobolales, Tremellales, Dothideales e Saccharomycetales. Os círculos lilases nos nós internos representam os valores de bootstrap baseados em mil réplicas.

Figura na página seguinte.



Fonte: elaborado pela autora.

3.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS CELULARES

As investigações voltadas para compostos bioativos substancialmente devem ter três alicerces primordiais: primeiro, a identificação de moléculas capazes de controlar doenças e patógenos que não tenham sido inibidos por nenhum composto sintético até então; segundo, o desenvolvimento de biocompostos que causam cada vez menos efeitos adversos e demonstrem sucesso inibitório aprimorado em relação a organismos multirresistentes; e, por último, a descoberta de biocompostos que possam substituir fármacos sintéticos, visando evitar o impacto resultante desse tipo de produção (Gupta et al., 2020).

Os extratos obtidos com as linhagens CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-02, aplicando-se o solvente apolar hexano, apresentaram rendimentos baixos ou nulos; por conta disso, não foi possível a sua utilização nos testes subsequentes. As frações extraídas no solvente acetato de etila foram as mais rentáveis para as linhagens CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-243 e PE-02. Esse solvente possui polaridade intermediária, com a qual vários compostos possuíam afinidade de extração. Entretanto, para a levedura CHAP-221, o maior rendimento de extração ocorreu na fase butanólica, que é polar, o que demonstra que a maioria dos compostos extraídos dessa linhagem possui afinidade mais polar, diferentemente das outras cinco leveduras anteriormente mencionadas. A fração aquosa foi a que apresentou os maiores rendimentos, uma vez que essa amostra representa o extrato refinado das extrações (Tabela 2).

As linhagens selvagens CHAP-221 e CHAP-243 apresentaram os maiores rendimentos de extração na fração aquosa com relação à matéria-prima para sua produção. Essa fração representa o refinado, o qual possui uma característica de maior rendimento. Entretanto, a maceração da biomassa celular das leveduras realizada com metanol pode favorecer extrações de algumas classes de compostos como os ácidos fenólicos e compostos antioxidantes. A polaridade que o metanol apresenta é alta, o que facilita a extração desses compostos, aumentando também o teor total de compostos desse tipo nas extrações obtidas (Lezoul et al., 2020; Stalikas, 2007; Peschel et al., 2006; Li et al., 2006).

Tabela 2 – Fracionamentos da biomassa das leveduras *Papilotrema laurenti*, *Meyerozyma caribbica*, *Rhodotorula* sp., *Aureobasidium* sp., *Meyerozyma* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* e seus respectivos rendimentos.

Biomassa de levedura cultivada		Extração e liofilização		
Cepa cultivada	Biomassa de levedura (g)	Solvente usado para extração	Extrato (g)	Rendimento (%)
<i>Papilotrema laurenti</i> (CHAP-158)	4,5441	Acetato de etila	0,3894	8,57
		Butanol	0,0281	0,62
		Aquosa	0,1773	3,90
<i>Meyerozyma caribbica</i> (CHAP-204)	5,6673	Acetato de etila	0,2048	3,61
		Butanol	0,0775	1,37
		Aquosa	0,8888	15,68
<i>Rhodotorula</i> sp. (CHAP-208)	6,0983	Acetato de etila	0,2766	4,54
		Butanol	0,1297	2,13
		Aquosa	0,8488	13,92
<i>Aureobasidium</i> sp. (CHAP-221)	12,9729	Acetato de etila	0,2608	2,01
		Butanol	0,3726	2,87
		Aquosa	2,3581	18,18
<i>Meyerozyma</i> sp. (CHAP-243)	8,6634	Acetato de etila	0,2028	2,34
		Butanol	0,1948	2,25
		Aquosa	1,5188	17,53
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-02)	5,2181	Acetato de etila	0,1575	3,02
		Butanol	0,0399	0,76
		Aquosa	0,5154	9,88

Fonte: elaborado pela autora.

3.3 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS CELULARES

Para avaliar a toxicidade dos extratos, foram empregados três modelos celulares. A linhagem VERO (um dos modelos de células não-tumorais) é derivada de fibroblastos, que são abundantemente distribuídos por todo o tecido conjuntivo. A principal função dos fibroblastos é atuar na síntese e secreção de matriz extracelular, proporcionando resistência, elasticidade e estrutura de tecidos e órgãos. Além disso, eles atuam na cicatrização de feridas, na manutenção dos tecidos e na regulação da inflamação (Mescher, 2013). Os extratos demonstraram baixa toxicidade frente à linhagem VERO, sendo que a maior parte deles não apresentou citotoxicidade até mesmo nas maiores concentrações testadas. As exceções foram os fracionamentos em acetato de etila e aquoso da levedura industrial PE-2, que ocasionaram redução de 50% da viabilidade celular com 130,6 µg/mL e 195,2 µg/mL dos extratos, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração de extrato que reduziu em 50% a viabilidade celular (CC₅₀, µg/mL) das linhagens A549, Vero e RAW com intervalo de confiança de 95% (ND: não determinada).

Extrato de leveduras	CC ₅₀ Linhagens celulares testadas (IC 95%)		
	A549	VERO	RAW
CHAP-158 Butanol	>200 (ND)	>200 (ND)	112,1 (101,3 a 124,9)
CHAP-158 Acetato de etila	146 (116,4 a 200,0)	>200 (ND)	171,9 (127,4 a 200,0)
CHAP-158 Aquosa	>200 (ND)	>200 (ND)	113,6 (102,5 a 126,0)
CHAP-204 Butanol	>500 (ND)	>500 (ND)	>500 (ND)
CHAP-204 Acetato de etila	>200 (ND)	>200 (ND)	169,7 (160,3 a 180,3)
CHAP-204 Aquosa	107,5 (95,39 a 121,9)	>200 (ND)	>200 (ND)
CHAP-208 Butanol	120,8 (85,88 a 190,4)	>200 (ND)	>200 (ND)
CHAP-208 Acetato de etila	>500 (ND)	>500 (ND)	>500 (ND)
CHAP-208 Aquosa	184,1 (163,1 a 200,0)	>200 (ND)	27,64 (25,06 a 49,25)
CHAP-221 Butanol	>500 (ND)	>500 (ND)	>500 (ND)
CHAP-221 Acetato de etila	>500 (ND)	>500 (ND)	>500 (ND)
CHAP-221 Aquoso	128,7 (97,21 a 178,9)	>200 (ND)	>200 (ND)
CHAP-243 Butanol	136,2 (101,7 a 190,9)	>200 (ND)	161,6 (145,9 a 177,3)
CHAP-243 Acetato de etila	>500 (ND)	>500 (ND)	>500 (ND)
CHAP-243 Aquosa	189,2 (168,2 a 200,0)	>200 (ND)	>200 (ND)
PE-02 Butanol	>200 (ND)	>200 (ND)	>200 (ND)
PE-02 Acetato de etila	190,9 (178,0 a 200,0)	130,6 (82,77 a 200,0)	>200 (ND)
PE-02 Aquosa	90,42 (74,32 a 112,6)	195,2 (112,2 a 200,0)	>200 (ND)
Paclitaxel	83,5x10 ⁻⁶ (1,971x10 ⁻⁶ a 258,1x10 ⁻⁶)	-	-
Controle H ₂ O ₂	-	-	<25 (ND)

Fonte: elaborado pela autora.

Os macrófagos são importantes células do sistema imune, especializadas na proteção do organismo. Por meio de fagocitose, essas células capturam patógenos e endocitam células mortas e seus detritos. Ademais, os macrófagos agem também em processos de cicatrização e inflamação (Mescher, 2016; Drake et al., 2020). Doze dos extratos testados não demonstraram ser citotóxicos para a linhagem celular RAW 264.7 (macrófagos murinos) até mesmo nas maiores concentrações testadas, e seis deles reduziram em 50% a viabilidade celular em concentrações entre 27,64 e 171,9 µg/mL. O extrato da levedura CHAP-208 no fracionamento aquoso apresentou a citotoxicidade mais elevada, com efeito semelhante àquele observado em células estimuladas com o peróxido de hidrogênio, que é altamente reativo (Tabela 3).

A linhagem celular derivada de carcinoma de pulmão humano (A549) foi utilizada como modelo para a determinação do potencial citotóxico dos extratos frente a células tumorais. Diante dela, o fracionamento aquoso da levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 e do isolado de lagarta *M. caribbica* CHAP-204 apresentaram os potenciais citotóxicos mais expressivos, com valores de CC₅₀ de 90,42 µg/mL e 107,5

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. É importante destacar que esses extratos não demonstraram toxicidade frente às células não tumorais VERO e RAW nas condições testadas (Tabela 3), indicando potencial seletividade em relação às células tumorais (A549).

De fato, a levedura *S. cerevisiae* vem ganhando destaque nos últimos anos com estudos voltados à produção de compostos com atividades anticâncer como anti-melanoma (Xu et al., 2022) e atividade anticancerígena em células de câncer de fígado, conforme reportado por Darwesh et al. (2023). É mister destacar que esses autores necessitaram de 700 $\mu\text{g/mL}$ de extrato liofilizado para diminuir 31% das células cancerígenas Huh7, enquanto nossos resultados demonstraram que uma concentração sete vezes menor (90,42 $\mu\text{g/mL}$) foi suficiente para reduzir em 50% a viabilidade de células tumorais.

Evidentemente, a administração do medicamento quimioterápico paclitaxel (utilizado para tratar vários tipos de câncer) exige concentrações muito menores. Entretanto, ao analisar a demanda de matéria-prima necessária para a produção do medicamento padrão ouro, aplicado em grande parte dos casos dessa doença, estima-se que sejam necessárias aproximadamente 700 árvores ou 10 toneladas de casca de *Taxus* spp. para produzir 1 kg de paclitaxel, quantidade suficiente para tratar cerca de 500 pacientes com câncer (Barrales-Cureño et al., 2022; Ye et al., 2012). A produção com baixo rendimento e alta demanda eleva o custo do medicamento, restringindo o acesso ao tratamento e, em alguns casos, não atendendo à necessidade. Além disso, é imprescindível o uso de grandes extensões de terra para o cultivo das plantas.

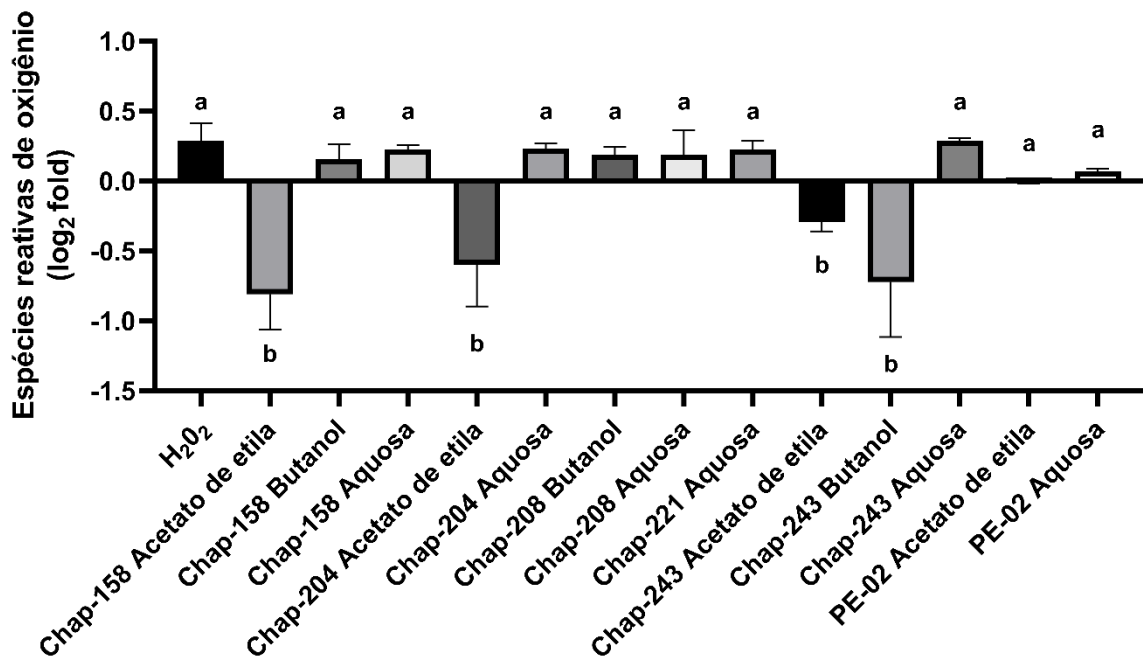
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os organismos são naturalmente expostos a situações que induzem a produção de radicais livres ou oxidantes. Essas substâncias são produzidas pelo metabolismo celular aeróbico ou geradas por efeito de radiação, calor e incidência luminosa. Por conta da sua capacidade reativa, os radicais livres capturam elétrons de biomoléculas causando lesões celulares (Halliwell e Gutteridge 1986). Dentre os mais significativos radicais livres estão as espécies reativas de oxigênio (ERO). Baixas quantidades de ERO são primordiais para os processos bioquímicos, como é o caso da sinalização e controle de crescimento das células, contenção dos agentes

infecciosos e da síntese enzimática. Por outro lado, concentrações elevadas ocasionam estresse oxidativo (Agarwal et al., 2004).

Entre todos os extratos testados, quatro apresentaram atividade antioxidante significativa (CHAP-158, CHAP-204 e CHAP-243, no fracionamento de acetato de etila e CHAP-243, em butanol), reduzindo as ERO nas células RAW (Figura 2). Em comparação com células de macrófagos expostas ao peróxido de hidrogênio, que possui alta atividade oxidativa, as células tratadas com os extratos reduziram a oxidação celular em 0,52, 0,31, 0,0048 e 0,43 \log_2 vezes, respectivamente. Merece destaque o extrato obtido da levedura isolada de abelha (*Meyerozyma* sp. CHAP-243) fracionado em acetato de etila, que reduziu significativamente as espécies reativas de oxigênio e não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas para o modelo de células de fibroblastos ou de macrófagos (Tabela 3).

Figura 2 – Detecção de ERO em linhagem de macrófagos (RAW) diante dos extratos produzidos. Diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).



Fonte: elaborado pela autora.

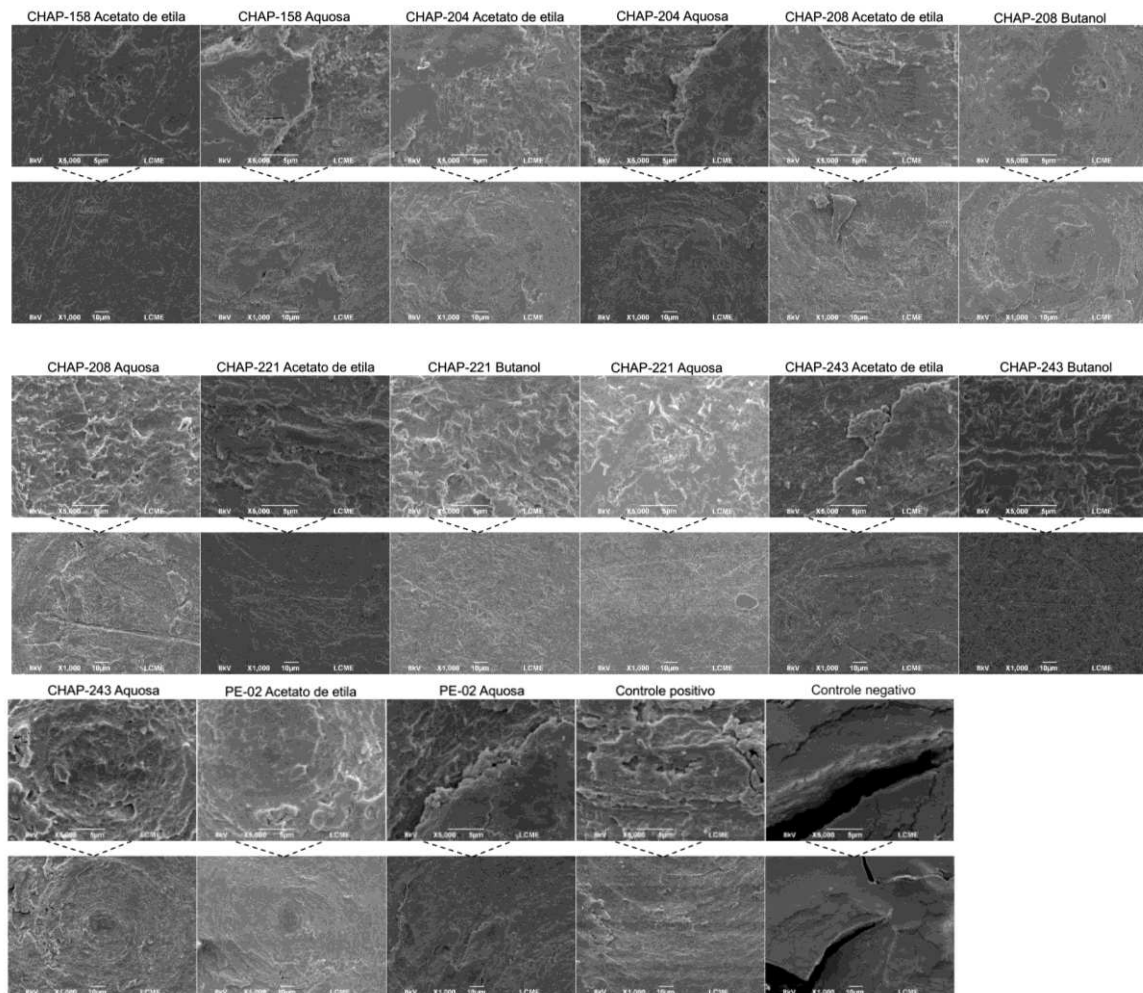
Um estudo conduzido por Bak e colaboradores (2024) demonstrou que a fermentação com as leveduras *S. cerevisiae* e *Pichia fermentans*, a partir da planta *Elaeocarpus sylvestris*, resulta em compostos com atividade antioxidante. Quando testado em células RAW 264.7, houve redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias em todas as concentrações avaliadas.

3.5 REDUÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS BIOMÉDICOS

3.5.2 Titânio

Quando utilizados sobre as células de *P. aeruginosa* aderidas no titânio, todos os extratos de levedura produzidos proporcionaram significativa redução bacteriana, em comparação com o controle bacteriano não tratado (Figura 3).

Figura 3 – Micrografias de superfícies de discos de titânio após os tratamentos com os extratos de leveduras mostrando a atividade de desagregação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Em cada tratamento, a linha superior corresponde a aumento de 5.000 vezes e a linha inferior, a aumento de 1.000 vezes.

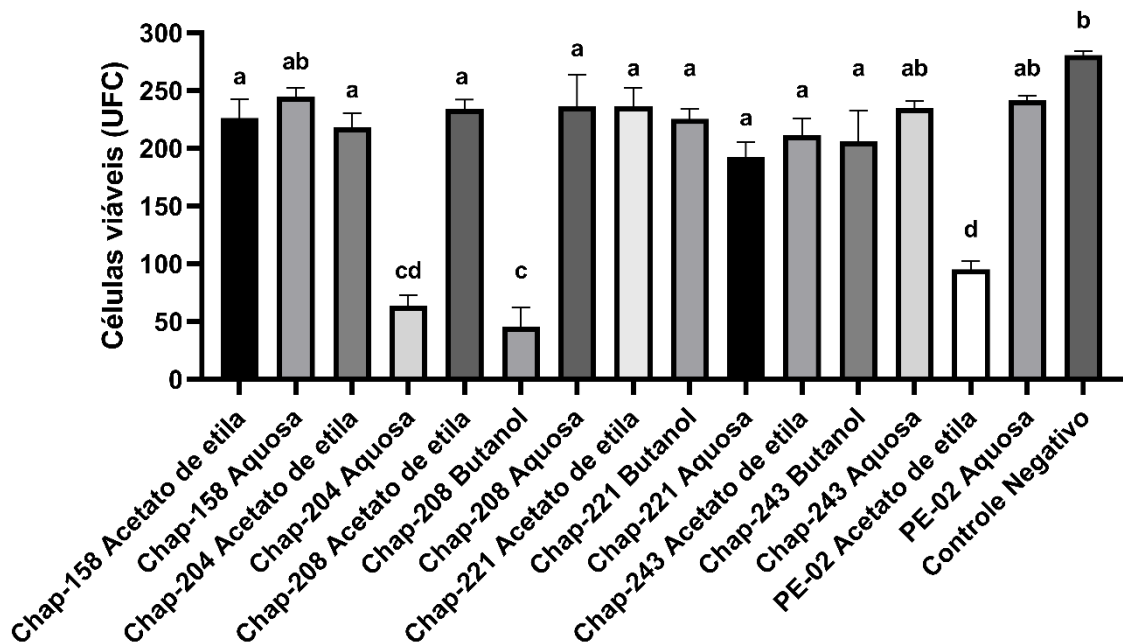


Fonte: elaborado pela autora.

Por meio da contagem de colônias bacterianas, foi possível mensurar o efeito dos extratos de levedura no controle de *P. aeruginosa*. Houve redução significativa de células bacterianas nos tratamentos utilizando os extratos liofilizados de CHAP-204

aquosa, CHAP-208 em butanol e PE-02 em acetato de etila, correspondendo a 77,58%, 83,99% e 66,19% de redução, respectivamente (Figura 4). Entre os outros nove extratos testados (representados pelas barras com a letra 'a'), observou-se uma redução de células bacterianas entre 16,63% e 31,59% (Figura 4), sendo essa redução estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle. Já os extratos aquosos da CHAP-158, CHAP-243 e PE-02 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle. Alam e seus colaboradores (2020) produziram extratos de plantas e, de forma semelhante, encontraram atividade anti-biofilme contra *P. aeruginosa*, variando de 15% a 80%, dependendo do solvente utilizado.

Figura 4 – Avaliação da redução do crescimento de *P. aeruginosa* em superfícies de titânio tratadas com extratos celulares de leveduras ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Diferentes letras minúsculas próximas às barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).



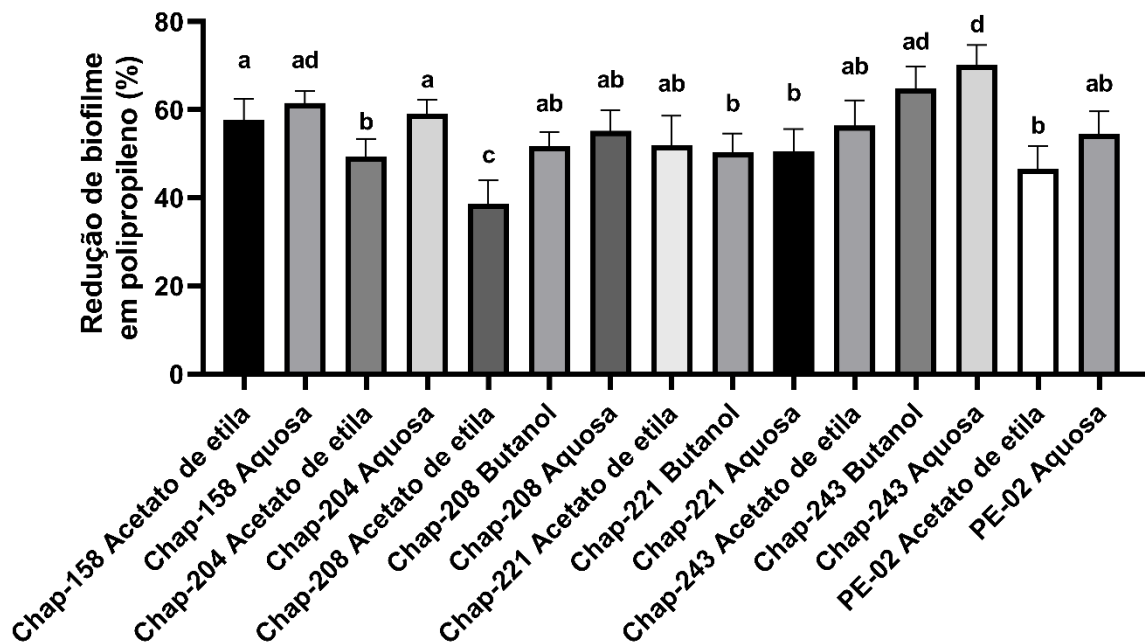
Fonte: elaborado pela autora.

Considerando que a expansão dos biofilmes está diretamente relacionada ao número e arranjo das células na região (Pokhre et al., 2024), a diminuição das unidades formadoras de colônia (UFC) é um fator positivo na redução desses agregados de células microbianas. É importante salientar que as UFC em titânio foram mensuradas sem que ocorresse diluição do meio de cultivo, e que os biofilmes foram submetidos a apenas um ciclo de tratamento com os extratos de leveduras.

3.5.2 Polipropileno

Quando testados sobre os biofilmes presentes nas superfícies de polipropileno, todos os extratos promoveram redução estatisticamente significativa da biomassa de *P. aeruginosa* agregada ao material. O extrato aquoso da CHAP-243 proporcionou uma redução de 70%, enquanto o fracionamento em butanol da mesma cepa resultou em uma redução de 64,87%. Cabe ressaltar também que o extrato aquoso da CHAP-158 levou a uma redução de 61,59%. Além disso, outros nove extratos testados mostraram mais de 50% de redução nesse tipo de biomaterial plástico, em comparação com o controle sem tratamento (Figura 5).

Figura 5 – Avaliação da redução do crescimento de *P. aeruginosa* em superfícies de polipropileno tratadas com extratos celulares de leveduras ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Diferentes letras minúsculas próximas às barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

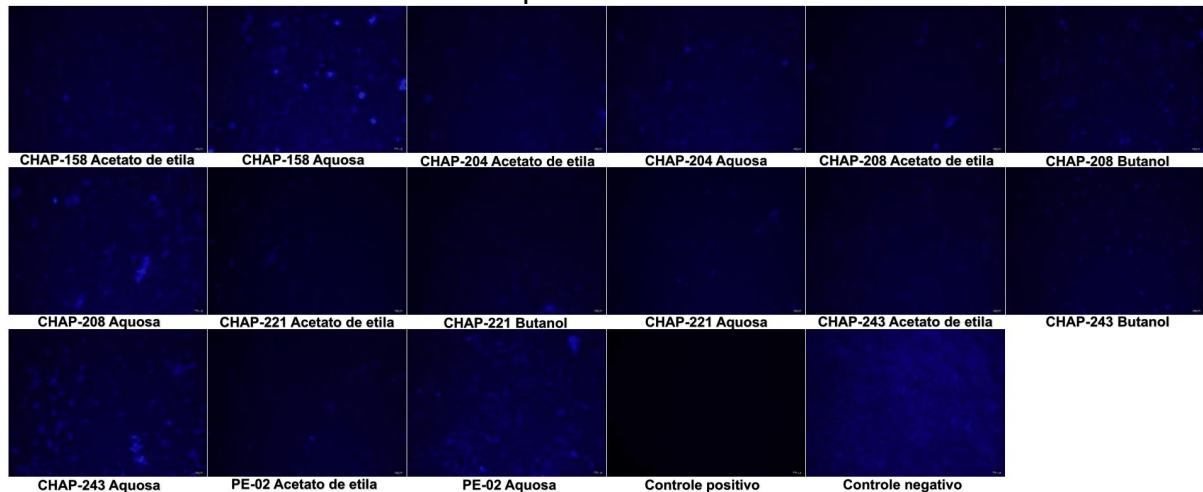


Fonte: elaborado pela autora.

Na Figura 6, observa-se que o marcador emitiu menor fluorescência nas micrografias onde os extratos foram utilizados como mitigadores da bactéria — no controle negativo, onde não houve nenhum tratamento, a fluorescência foi intensa pela presença maior de células bacterianas viáveis. Isso ocorre pois os extratos

reduziram a formação de biofilmes aderido em PP, resultando em menos DNA bacteriano, rico em adenina e timina, disponível para ligação com o marcador fluorescente, diminuindo assim a emissão de fluorescência.

Figura 6 – Micrografia da atividade de desagregação do biofilme de *P. aeruginosa* clínica em superfícies de polipropileno. As imagens correspondem a um aumento de 1.000 vezes para cada amostra testada.



Fonte: elaborado pela autora.

A formação de biofilme é um processo que envolve a interação e o comportamento coordenado de uma comunidade bacteriana. Esse fenômeno depende da regulação do Quorum Sensing (QS), que é um sistema de comunicação célula-célula. Por meio do QS, as bactérias detectam a densidade populacional e ajustam suas atividades, inclusive a formação de biofilmes (Carette2020; Díaz-Pérez et al., 2023; Wang 2022a). Os sistemas QS são vitais no desenvolvimento de biofilme e na virulência de *P. aeruginosa* (Alayande et al., 2018). Quando a densidade populacional das bactérias é reduzida, a formação de biofilmes e a virulência da *P. aeruginosa* são fragilizadas. Além desta patogenicidade crítica da *P. aeruginosa*, é relatado por Wang e colaboradores (2022b) que a bactéria provoca uma considerável degradação do polipropileno quando mantida em contato com o biomaterial, causando assim maiores danos aos pacientes que utilizam o PP.

3.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS EXTRATOS CELULARES

O ácido p-cumárico foi o composto predominante em oito dos dezoito extratos celulares produzidos. O maior teor desse composto fenólico foi no extrato da levedura industrial (*S. cerevisiae* PE-02) em acetato de etila com 1,037 mg de ácido p-cumárico em 50 mg de extrato. Nos extratos da CHAP-204 e CHAP-243 em acetato de etila e da CHAP-243 em butanol, esse composto fenólico foi quantificado em 0,156, 0,136 e 0,066 mg de composto a cada 50 mg de extrato, respectivamente (Tabela 4). Interessantemente, estes três extratos demonstraram atividade antioxidante quando testados nas células do sistema imunitário (Figura 2). O ácido p-cumárico é descrito como redutor de ERO, uma vez que ocorre o deslocamento dos elétrons livres ao longo do grupo fenol, fornecendo assim a carga negativa necessária para que ocorra a reação de oxidação e evitando que as células sofram esse estresse. Existem evidências de que o composto contribui para o tratamento de patologias como inflamação, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças do sistema nervoso (Chen et al., 2024; Aldaba-Muruato et al., 2021).

Vale destacar também que o extrato aquoso da levedura industrial (*S. cerevisiae* PE-2), com 0,110 mg de ácido p-cumárico em 50 mg de extrato, demonstrou ser capaz de reduzir em 50% a proliferação de células de carcinoma pulmonar humano. Esse composto fenólico vem sendo testado frente a células cancerígenas gástricas (Jang et al., 2020), células de melanoma (Hu et al., 2020) e células de câncer colorretal (Tehami et al., 2023).

De fato, o ácido p-cumárico pode ser encontrado em produtos fermentados, como é o caso do vinho e do vinagre (Gálvez et al., 1994; An et al., 2024). Além disso, esse composto fenólico também é encontrado em pólen e mel (Mao et al., 2013), que são produtos essenciais para a sobrevivência e o funcionamento da colmeia. O presente estudo utilizou três linhagens celulares proveniente de flores e de abelha (CHAP-208, CHAP-221 e CHAP-243, vide Quadro 1). Nos fracionamentos em acetato de etila dessas leveduras e nos extratos em butanol de duas delas, foi quantificada a presença de ácido p-cumárico (Tabela 4).

Tabela 4 – Compostos fenólicos quantificados (em mg) ou detectados em 50 mg de extrato. ND: não determinado.

Extrato de leveduras	Quercetina	Miricetina	Kaempferol	Ácido caféico	Epicatequina	Ácido p-cumárico	Pirocatecol	Ácido síringico	Flavona	Ácido gálico	Epigallocatequina
CHAP-158 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-158 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-158 Aquosa	ND	ND	ND	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Acetato de etila	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	0,156	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Aquosa	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	ND	0,188	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Aquosa	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Butanol	ND	ND	ND	ND	Detectado	0,220	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	ND	0,286	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,094
CHAP-243 Butanol	ND	ND	ND	ND	Detectado	0,066	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-243 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	Detectado	0,136	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-243 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado
PE-02 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PE-02 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	1,807	1,037	ND	ND	ND	ND	ND
PE-02 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	0,110	ND	ND	ND	ND	ND

Fonte: elaborado pela autora.

Adicionalmente, no extrato da cepa CHAP-204 em acetato de etila, que demonstrou promissora atividade antioxidante, e no fracionamento aquoso das cepas CHAP-204 e CHAP-208, foram detectados três flavonoides com ações antioxidantes (Tabela 4): quercetina (Qi et al., 2022), miricetina (Agraharam et al., 2022) e kaempferol (Chen et al., 2023). Além disso, nos extratos da levedura CHAP-243 em acetato de etila e butanol, a epicatequina também foi detectada (Tabela 4). Este flavonoide é descrito por apresentar função nas respostas celulares ao estresse oxidativo, redução da inflamação e melhora da força muscular (Nichols et al., 2015; Bernatoniene e Kopustinskiene 2018; Araújo et al., 2019; Mafi et al., 2019). Com exceção da epicatequina no extrato da PE-2 em acetato de etila (1,807 mg em 50 mg), não foi possível a quantificação de flavonoides que se apresentaram em quantidades muito baixas; nesse caso, foram apenas detectados pelo cromatógrafo, pois suas concentrações ficaram abaixo dos limites da curva padrão.

Um estudo que utilizou a levedura *Wickerhamomyces anomalus* para fermentação de flores de macieira detectou a produção de alguns compostos bioativos que também encontramos no presente trabalho, como ácido cafeico, kaempferol, quercetina e epicatequina (Tonini et al., 2024). Os autores do trabalho quantificaram

cerca de 2 µg/mg de epicatequina em suas amostras, enquanto o nosso fracionamento em acetato de etila com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 apresentou 36 µg/mg (1,807 mg/50 mg) desse composto (Tabela 4).

Portanto, no extrato da levedura industrial em acetato de etila, além dos 2% de ácido p-cumárico também foram quantificados cerca de 3,6% de epicatequina. É importante ressaltar que esse extrato promoveu uma redução significativa da viabilidade bacteriana em titânio e polipropileno (Figuras 4 e 5). Em um estudo utilizando *P. aeruginosa*, foi relatado que compostos do grupo das catequinas associados a mircetina podem reduzir em dois terços a quantidade de antibiótico inicialmente necessária para inibir essa bactéria (Buchmann et al., 2022). Outros autores observaram que a epicatequina foi eficaz quando testada para redução das bactérias orais *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (Ezhil et al., 2017). Por sua vez, o ácido p-cumárico tem sido citado como potencial agente para reduzir a biomassa de biofilmes de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos (Singha et al., 2023).

Além do ácido p-cumárico, o ácido cafeico e a quercetina também foram identificados e confirmados como os principais compostos anti-biofilme de *P. aeruginosa* (Lou et al., 2015). Esses mesmos três compostos foram produzidos pelas leveduras no presente estudo e encontrados em extratos que apresentaram ação contra o biofilme bacteriano dessa mesma bactéria, tanto em titânio quanto em polipropileno (Tabela 4, Figuras 4 e 5).

Cabe aqui ressaltar também a importância da sinergia dos compostos presentes em uma fração de extração. Portanto, os compostos não podem apenas ser considerados isoladamente. Diversas substâncias simultaneamente presentes podem interferir na dinâmica de ação, mesmo que em pequenas quantidades (Buchmann et al., 2022; Sitarek et al., 2020; Masterson et al., 2023).

Na análise dos extratos produzidos, com foco na identificação das moléculas presentes (conforme apresentado na Tabela 4), esperava-se obter uma quantificação mais expressiva desses compostos. No entanto, alguns deles foram apenas detectados, pois as quantidades identificadas ficaram abaixo da curva padrão (inviabilizando a mensuração). Além disso, é importante considerar que aumentar excessivamente as concentrações dos extratos no solvente pode alterar as propriedades dos fluidos, o que aumenta o risco de danificar o equipamento. Dado que hoje já existem técnicas de cromatografia mais avançadas, e considerando que o grupo de pesquisa prevê a aquisição de um novo equipamento com um limite de

detecção mil vezes superior ao utilizado neste trabalho, planeja-se retomar os ensaios de quantificação dos extratos celulares utilizando o novo cromatógrafo.

3.7 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS SOBRENADANTES DOS CULTIVOS DAS LEVEDURAS

As superfícies das células de leveduras são sensíveis a interferências ambientais. As informações exteriores são transmitidas para o citoplasma pelas vias de transdução de sinal, definindo se as substâncias vão ser absorvidas ou impedidas de adentrar as células. Assim, são controladas a entrada de produtos químicos e a secreção ou excreção de substâncias. Ademais, diferentes compostos exercem funções de comunicação entre células (Hapala et al., 2013). De fato, sabidamente pequenas moléculas podem se difundir por meio da membrana e da parede celular das leveduras (Mandaji et al., 2022; Günal-Köroğlu et al., 2024). Em trabalho recente, por exemplo, Bak e colaboradores (2024) justamente detectaram atividade antioxidante em meios de cultura fermentados por *P. fermentans* e *S. cerevisiae*. Por conta disso, avaliamos também os metabólitos das leveduras secretados em seu meio de cultivo, a fim de analisar a presença de possíveis compostos bioativos (Tabela 5).

O 2-feniletanol (um álcool superior) demonstrou ser o composto mais prevalente e em maiores quantidades nos seis sobrenadantes resultantes do cultivo das leveduras. A abundância relativa do 2-feniletanol nas amostras variou entre 21,02% e 85,81%. Novamente, a levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 se destacou dentre as demais (Tabela 5). Esses dados corroboram dados de trabalho anterior, que apontam essa linhagem como grande produtora de 2-feniletanol (Eshkol et al., 2009). Interessantemente, foi demonstrado que esse composto orgânico volátil possui atividade bacteriostática diante de *Escherichia coli* (Kleinwächter et al., 2021) e atividade bactericida contra *P. aeruginosa*, provocando alterações na integridade estrutural da membrana plasmática das bactérias e a perda de viabilidade celular (Corre et al., 1990).

Tabela 5 – Análise semiquantitativa dos compostos orgânicos voláteis (VOC's) e terpenos presentes no meio de cultivo das linhagens de leveduras CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-02.

SOBRENADANTE CEPA	COMPOSTO	ÁREA %	Índice de similaridade
CHAP-158	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	21,05	98
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	5,23	92
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster mono(2-etilhexil)	1,29	86
CHAP-204	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	32,31	98
	2-Piperidinona; 2-Piperidona	3,91	95
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	2,02	88
	Octadecano; n-Octadecano	0,85	93
	Ácido tridecanóico, 2-etil-2-metil-, éster etílico	1,55	74
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster bis(2-metilpropil); Ácido ftálico, éster diisobutil	1,02	94
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil; Ftalato de diisooctil	1,09	90
CHAP-208	3-etil-3-metilheptano, heptano, 3-etil-3-metil-	0,72	90
	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	64,75	98
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	0,94	91
	Acetamida, N-(2-fenil-); Acetamida, N-fenil-	4,92	97
	Nonadecano, 9-metil-; 9-Metilnonadecano	0,45	81
	1H-indole-3-etanol; Indol-3-etanol	2,41	92
	Tetracontano; n-Tetracontano	0,78	76
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil; Ftalato de diisooctil	1,00	94
CHAP-221	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	81,33	98
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	1,09	92
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil; Ftalato de diisooctil	0,63	89
CHAP-243	3-Etil-3-metilheptano; Heptano, 3-etil-3-metil-	2,06	89
	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	50,29	98
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	1,39	89
	1H-indole-3-etanol; Indol-3-etanol	2,46	81
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil; Ftalato de diisooctil	0,95	88
PE-02	Álcool Fenilético; Benzenoetanol	85,81	98
	2-Piperidinona; 2-Piperidona	0,66	96
	Benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetil-2-propil-); Benzeno, m-di-terc-butil-	0,45	90
	Benzeno, [(metoximetoxi)metil]-; [(Metoximetoxi)metil]benzeno	0,44	88
	1H-indole-3-etanol; Indol-3-etanol	1,90	92
	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil; Ftalato de diisooctil	0,27	90

Fonte: elaborado pela autora.

3.8 ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DAS LEVEDURAS TESTADAS

Ainda que compostos bioativos possam ser obtidos a partir de plantas e fungos filamentosos, a utilização desses organismos apresenta desvantagens em relação a leveduras. Fungos filamentosos, por exemplo, demandam cultivos que podem exigir longos períodos de incubação, e, no caso das plantas, existe a dependência de fatores ambientais e do microclima, além das dificuldades de transporte e armazenamento. Ademais, a extração vegetal pode resultar em rendimentos insuficientes e danos aos ecossistemas. A obtenção de moléculas vegetais é complexa, com custos elevados que muitas vezes inviabilizam a produção (Liu et al., 2024).

Por outro lado, relatos científicos demonstram que a utilização de leveduras para a produção de moléculas é uma forma alternativa capaz de tornar a produção escalável, rápida e sustentável quando comparadas com as fontes atuais (Nett, 2024; Gomes et al., 2022; Liu et al., 2024). Adicionalmente, leveduras representam uma matéria-prima facilmente disponível e em grande quantidade, considerando as indústrias produtoras de cerveja (Flores-Copa et al., 2021), vinho (Devesa-Rey et al., 2011) e etanol (Ahuja et al., 2023), que, ao fim de seus processos, geram um acúmulo de grandes quantidades de biomassa de células desse eucarioto unicelular (De Oliveira et al., 2022).

Levando em conta apenas a produção brasileira de etanol, foram produzidos 35,4 bilhões de litros desse combustível no ano de 2023 segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2024). Estima-se que sejam gerados 30 g de biomassa de levedura para cada litro de etanol produzido (Modesto et al., 2021). Assim sendo, só com a produção do combustível, o Brasil produz mais de 10 bilhões de quilos de biomassa residual de leveduras por ano.

Além da capacidade produtiva de biomoléculas, nossos dados demonstraram que as leveduras testadas foram capazes de crescer em meios de cultivo contendo glicose e xilose, os dois monossacarídeos predominantes nos hidrolisados lignocelulósicos oriundos de resíduos agroindustrias (Singh et al., 2022; Adewuyi, 2022). Portanto, essa pode ser outra vantagem na aplicação de leveduras na produção de biomoléculas, uma vez que o custo e o valor comercial dos bioativos podem ser reduzidos se forem produzidos a partir de matéria-prima residual (ou seja, empregando-se resíduos para o crescimento das leveduras) (Faria et al., 2023). A obtenção de matérias-primas a partir de materiais pouco valorizados, ou até mesmo considerados resíduos, revertidos para a produção de compostos com altos valores agregados com potenciais benéficos, impulsiona a inovação em setores distintos da sociedade e contribuem para o desenvolvimento de estratégias de economia circular, uma vez que os próprios resíduos passam a ser os insumos para a produção de novos produtos (Ewing et al., 2022; Elroi et al., 2023).

4 CONCLUSÕES

A análise das sequências das regiões ITS das leveduras que ainda não haviam sido identificadas permitiram classificá-las como *Rhodotorula* sp., *Aureobasidium* sp. e *Meyerozyma* sp. No entanto, para uma identificação em nível de espécie, é determinante que os domínios D1/D2 dessas três linhagens sejam também sequenciados. A essas três leveduras, somaram-se outras de grupos taxonômicos distintos (previamente identificadas), aumentando a representatividade da biodiversidade de leveduras analisadas no presente trabalho.

Em termos de rendimento dos extratos, foi possível observar uma tendência decrescente nos fracionamentos empregando solventes orgânicos. Os maiores rendimentos foram alcançados nas fases aquosa, acetato de etila, butanólica e hexânica, respectivamente.

Os resultados sugerem também que extratos de leveduras isoladas de ambientes da microbiota brasileira apresentam potencial para redução de produção de ERO, de biofilme bacteriano (tanto em titânio quanto em polipropileno) e de viabilidade de células tumorais *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que todas as cepas produzem uma variedade de compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis que poderiam potencialmente mitigar problemas de saúde humana. Ademais, como perspectiva deste estudo, propomos otimizar os protocolos de cromatografia com vistas a determinações mais sensíveis dos compostos bioativos presentes nos extratos.

Considerando a crescente demanda por fontes alternativas para a produção desses compostos, esses microrganismos podem representar um recurso valioso. Portanto, estudos mais aprofundados sobre as possibilidades de aplicação destes microrganismos são biotecnologicamente promissores e relevantes.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, Owen et al. **Do ‘passive’ medical titanium surfaces deteriorate in service in the absence of wear?** Journal of the Royal Society Interface, v. 9, n. 76, p. 3161-3164, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0438>>. Acesso em: 07 mar. 2024.
- ADEWUYI, Adewale. **Underutilized lignocellulosic waste as sources of feedstock for biofuel production in developing countries.** Frontiers in Energy Research, v. 10, p. 741570, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.741570>>. Acesso em: 07 mar. 2024.
- AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SIKKA, Suresh. **The role of free radicals and antioxidants in reproduction.** Current opinion in obstetrics and gynecology, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e>>. Acesso em: 07 mar. 2024.
- AGRAHARAM, Gopikrishna; GIRIGOSWAMI, Agnishwar; GIRIGOSWAMI, Koyeli. **Myricetin: a multifunctional flavonol in biomedicine.** Current pharmacology reports, p. 1-14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40495-021-00269-2>>. Acesso em: 27 jun. 2024.
- AHUJA, Vishal et al. **Yeast-mediated biomass valorization for biofuel production: A literature review.** Fermentation, v. 9, n. 9, p. 784, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation9090784>>. Acesso em: 27 jun. 2024.
- ALAM, Khan et al. **Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** Journal of Infection and Public Health, v. 13, n. 11, p. 1734-1741, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.007>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- ALAYANDE, Abayomi Babatunde; AUNG, Mar Mar; KIM, In S. **Correlation between quorum sensing signal molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s biofilm development and virulency.** Current microbiology, v. 75, p. 787-793, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-018-1449-5>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- ALBARELLO, Maria LR et al. **Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae.** BioEnergy Research, p. 1-12, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-023-10616-4>>. Acesso em: 07 mar. 2024.
- ALDABA-MURUATO, Liseth Rubí et al. **Therapeutic perspectives of p-coumaric acid: Anti-necrotic, anti-cholestatic and anti-amoebic activities.** World Academy of Sciences Journal, v. 3, n. 5, p. 1-8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/wasj.2021.118>>. Acesso em: 01 jun. 2024.
- ALGE, Daniel L. et al. **Poly (propylene fumarate) reinforced dicalcium phosphate dihydrate cement composites for bone tissue engineering.** Journal of Biomedical

Materials Research Part A, v. 100, n. 7, p. 1792-1802, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.34130>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

ÁLVAREZ-PÉREZ, Sergio. **Ecology: Yeasts on Their Natural Environment**. In Yeasts: From Nature to Bioprocesses; Alves, S.L., Jr., Treichel, H., Basso, T.O., Stambuk, B.U., Eds.; Bentham Books: Singapore, 2022; pp. 27–57. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/9789815051063122020004>>. Acesso em: 16 mai. 2024.

ALVES, Sérgio Luiz Júnior et al. (Ed.). **Yeasts: From Nature to Bioprocesses**. Bentham Science Publishers, 2022. Disponível em: <[10.2174/97898150510631220201](https://doi.org/10.2174/97898150510631220201)>. Acesso em: 16 mai. 2024.

AMIEL, Eyal et al. **Pseudomonas aeruginosa evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression**. Infection and immunity, v. 78, n. 7, p. 2937-2945, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.00144-10>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

AN, Huihui et al. **Denovo Production of Resveratrol by Engineered Rice Wine Strain Saccharomyces cerevisiae HJ08 and Its Application in Rice Wine Brewing**. Journal of Fungi, v. 10, n. 8, p. 513, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof10080513>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

ANIL, Sukumaran et al. **Cytotoxicity and cell viability assessment of biomaterials**. 2023. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/87273>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

ANSARI, Mojtaba; DARVISHI, Ahmad. **A review of the current state of natural biomaterials in wound healing applications**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 12, p. 1309541, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1309541>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **[Evolução da produção de Etanol]**. Painel Dinâmico, [2024]. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiMmRhZWU2NDUtZWE2Yi00NzI5LWJjMGQtNjIwNjE0MjM0MjEzIiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTl0YTtytNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzIxMyJ9>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da saúde. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 46, DE 28 DE AGOSTO DE 2009**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_46_2009_COMP.pdf/2148a322-03ad-42c3-b5ba-718243bd1919>. Acesso em: 27 jun. 2024.

ARAÚJO, Clináscia Rodrigues Rocha et al. **Anti-inflammatory and cytotoxic activities of the extracts, fractions, and chemical constituents isolated from Luehea ochrophylla Mart**. BMC complementary and alternative medicine, v. 19, p. 1-10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2701-7>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

ARGUESO, Juan Lucas et al. **Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production.** Genome research, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1101/gr.091777.109>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

AYADI, Ines et al. **Microbial bioactive compounds from oleaginous yeast culture: insights into molecular docking interactions and toxicity prediction.** Biomass Conversion and Biorefinery, p. 1-19, 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-024-05516-2>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

BAK, Ji-yeong Jessica et al. **Biological and Chemical Enhancements of *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus* through Fermentation: Implications for Therapeutic and Industrial Applications.** Food Bioscience, p. 104838, 2024. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104838>>. Acesso em: 05 ago. 2024.

BARRALES-CUREÑO, Hebert Jair; RAMOS VALDIVIA, Ana C.; SOTO HERNÁNDEZ, Marcos. **Increased production of taxoids in suspension cultures of *Taxus globosa* after elicitation.** Future Pharmacology, v. 2, n. 1, p. 45-54, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010004>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

BASSO, Luiz C. et al. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.** FEMS yeast research, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

BERNATONIENE, Jurga; KOPUSTINSKIENE, Dalia Marija. **The role of catechins in cellular responses to oxidative stress.** Molecules, v. 23, n. 4, p. 965, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules23040965>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

BHUVANESHWARI, S.; HETTIARACHCHI, Hiroshan; MEEGODA, Jay N. **Crop residue burning in India: policy challenges and potential solutions.** International journal of environmental research and public health, v. 16, n. 5, p. 832, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph16050832>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

BLAIR, Jessica M.A. et al. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** Nature reviews microbiology, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. **[Biodiversidade]**. Santa Catarina, [2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade#:~:text=O%20Brasil%20ocupa%20quase%20metade,e%20tr%C3%AAs%20grandes%20ecossistemas%20marinhos>. Acesso em: 22 jul. 2024.

BRASIL. Ministério da saúde. **[Saúde Única]**. Santa Catarina, [2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/saude->

CASTRESANA, Jose. **Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis**. *Molecular biology and evolution*, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

CHANG, Guang-Wei et al. **An in vivo evaluation of a novel malleable composite scaffold (polypropylene carbonate/poly (D-lactic acid)/tricalcium phosphate elastic composites) for bone defect repair**. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 80, p. 813-819, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.06.022>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

CHEN, Feixiang et al. **P-Coumaric Acid: Advances in Pharmacological Research Based on Oxidative Stress**. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 5, p. 416-436, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/0115680266276823231230183519>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

CHEN, Jun et al. **A Critical Review of Kaempferol in Intestinal Health and Diseases**. *Antioxidants*, v. 12, n. 8, p. 1642, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox12081642>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

CHEN, Yu Wai. **How to prepare a DNA sequencing chromatogram for publication**. *Technical Tips Online*, v. 6, n. 1, p. 37-38, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1366-2120\(08\)70164-8](https://doi.org/10.1016/S1366-2120(08)70164-8)>. Acesso em: 15 jul. 2024.

CHI, Zhe et al. **Bio-products produced by marine yeasts and their potential applications**. *Bioresource technology*, v. 202, p. 244-252, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.039>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

CIAN, Raúl E.; DRAGO, Silvina R. **Microbial Bioactive Peptides from Bacteria, Yeasts, and Molds. In: Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 1-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-81404-5_19-1>. Acesso em: 23 jul. 2024.

CORRE, J. et al. **Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations**. *Research in Microbiology*, v. 141, n. 4, p. 483-497, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(90\)90074-z](https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90074-z)>. Acesso em: 06 jul. 2024.

DARWESH, Osama M. et al. **Application of environmental-safe fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for increasing the cinnamon biological activities**. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 10, n. 1, p. 12, 2023. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s40643-023-00632-9>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

DA ROSA FREITAS, Valdionir; VAN DER SAND, Sueli Teresinha; SIMONETTI, Amauri Braga. **Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação**. *Rev Odontol UNESP*, v. 39, n. 4, p. 193-200, 2010. Disponível: <<https://host-article->

assets.s3.amazonaws.com/rou/588018b07f8c9d0a098b4d81/fulltext.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2024.

DAVOUDI, Mehdi et al. **Characteristics, treatments, and management for disposal of sanitary wastewater in South Pars Gas processing plants**. Journal of Natural Gas Science and Engineering, v. 19, p. 91-97, 2014. Disponível: <<https://doi.org/10.1016/j.jngse.2014.04.021>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

DE CASTRO, Luis A. S. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. 2002. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744135/1/documento93.pdf>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

DEMAIN, Arnold L.; Martens, Evan. **Production of Valuable Compounds by Molds and Yeasts**. J. Antibiot. 2017, 70, 347–360. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ja2016121>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

DE MATOS NASCIMENTO, Andressa et al. **Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer**. Science of the Total Environment, v. 745, p. 140711, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140711>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

DE OLIVEIRA, Ana Maria; DE OLIVEIRA JUNIOR, Enio Nazaré. **Yeast Biomass: A By-Product for Application in the Food, Energy, Plastics, and Pharmaceutical Industries**. In: **Handbook of Waste Biorefinery: Circular Economy of Renewable Energy**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 463-484. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-06562-0_16>. Acesso em: 04 jul. 2024.

DEREEPER, Alexis et al. **BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis**. BMC evolutionary biology, v. 10, p. 1-6, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

DEREEPER, Alexis et al. **Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist**. Nucleic acids research, v. 36, n. suppl_2, p. W465-W469, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

DESHPANDE, Milind S.; RALE, Vinay B.; LYNCH, James M. **Aureobasidium pullulans in applied microbiology: a status report**. Enzyme and Microbial Technology, v. 14, n. 7, p. 514-527, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90122-5)>. Acesso em: 04 jul. 2024.

DEVESA-REY, R. et al. **Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling**. Waste management, v. 31, n. 11, p. 2327-2335, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.06.001>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

DIAS, Bruna et al. **Yarrowia lipolytica produces lipid-rich biomass in medium mimicking lignocellulosic biomass hydrolysate**. Applied Microbiology and Biotechnology, p. 1-13, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12565-6>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

DÍAZ-PÉREZ, Sharel Pamela et al. **Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm-associated is dependent on the pyoverdine and pyocyanin siderophores by quorum sensing modulation.** *Microbial Ecology*, v. 86, n. 1, p. 727-741, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

DI FRANCESCO, Alessandra et al. **Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens.** *Biological Control*, v. 81, p. 8-14, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.10.004>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

DOOLAM, Balaji et al. **A systematic review of potential bioactive compounds from *Saccharomyces cerevisiae*: exploring their applications in health promotion and food development.** *Environment, Development and Sustainability*, p. 1-38, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10668-024-04969-9>>. Acesso em: 23 jul. 2024.

DÖRING, G. et al. **Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus.** *European Respiratory Journal*, v. 16, n. 4, p. 749, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.16d30.x>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

DRAKE, Richard L.; VOGL, Wayne A.; MITCHELL Adam W. M. **Gray's anatomy for students.** 4th ed. Elsevier, 2020.

DUCLUZEAU, R.; Bensaada, M. **Comparative Effect of a Single or Continuous Administration of *Saccharomyces Boulardii* on the Establishment of Various Strains of *Candida* in the Digestive Tract of Gnotobiotic Mice.** *Ann. Microbiol.* 1982, 133, 491–501. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/6762128>>. Acesso em: 05 jul. 2024.

ELROI, Hadad et al. **Enhancing waste resource efficiency: circular economy for sustainability and energy conversion.** *Frontiers in Environmental Science*, v. 11, p. 1303792, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1303792>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

EMBRAPA. **Agricultura nas mãos de microrganismos benéficos.** [2020]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/51405622/agricultura-nas-maos-de-microrganismos-beneficos>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

ESHKOL, N. et al. **Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain.** *Journal of applied microbiology*, v. 106, n. 2, p. 534-542, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04023.x>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM. **CDC publishes report on antibiotic resistance threats in the United States for the first time.** *Eurosurveillance* 18:5. [2013]. Disponível em:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/_layouts/forms/Review_DispForm.aspx?List=a3216f4c-f040-4f51-9f77-a96046dbfd72&ID=752&RootFolder=%2Fen%2Factivities%2Fsciadvice%2FLists%2FECD%20Reviews&Web=0be238ef-4498-4962-8826-2e082a1f1639>. Acesso em: 11 mar. 2024.

EWING, Tom A. et al. **Fermentation for the production of biobased chemicals in a circular economy: a perspective for the period 2022–2050**. *Green Chemistry*, v. 24, n. 17, p. 6373-6405, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/D1GC04758B>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

EZHIL, Ilakkiya; LAKSHMI, T. **Antibacterial efficacy of epicatechin and rutin from *Acacia catechu* leaf extract against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*-An in vitro study**. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, v. 7, n. 1-2017, p. 22-24, 2017. Disponível em: <<https://www.cabidigitalibrary.org/doi/full/10.5555/20183016001>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

FARIA, Douglas José; CARVALHO, Anna Paula Azevedo de; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam. **Valorization of fermented food wastes and byproducts: Bioactive and valuable compounds, bioproduct synthesis, and applications**. *Fermentation*, v. 9, n. 10, p. 920, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation9100920>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

FENNER, Eduardo D. et al. **Nature's most fruitful threesome: The relationship between yeasts, insects, and angiosperms**. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 10, p. 984, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof8100984>>. Acesso em: 18 jul. 2024.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, 2015.

FIEDOR, Joanna; BURDA, Květoslava. **Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease**. *Nutrients*, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu6020466>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. **The biofilm matrix**. *Nature reviews microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>>. Acesso em: 04 abr. 2024.

FLORES-COPA, Vidal et al. **Residual brewing yeast as substrate for Co-production of cell biomass and biofilm using *Candida maltosa* SM4**. *Fermentation*, v. 7, n. 2, p. 84, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation7020084>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

FURUKAWA, S.; KUCHMA, S. L.; O'TOOLE, G. A. **Keeping their options open: acute versus persistent infections**. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 4, p. 1211-1217, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1211-1217.2006>>. Acesso em: 06 mar. 2024

FRANCIS, Vanessa I.; STEVENSON, Emma C.; PORTER, Steven L. **Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa***. FEMS microbiology letters, v. 364, n. 11, p. fnx104, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx104>>. Acesso em: 06 mar. 2024.

GÁLVEZ, Miguel Carrero; GARCÍA BARROSO, C.; PÉREZ-BUSTAMANTE, Juan Antonio. **Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples**. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, v. 199, n. 1, p. 29-31, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01192948>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

GANEVA, Valentina et al. **Extraction of proteins and other intracellular bioactive compounds from baker's yeasts by pulsed electric field treatment**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 8, p. 552335, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.552335>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

GANJALINIA, Atiyeh; AKBARI, Somaye; SOLOUK, Atefeh. **Tuning poly (L-lactic acid) scaffolds with poly (amidoamine) and poly (propylene imine) dendrimers: surface chemistry, biodegradation and biocompatibility**. Journal of Macromolecular Science, Part A, v. 58, n. 7, p. 433-447, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10601325.2021.1880935>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert EW. ***Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses**. Pathogens and disease, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

GEETHA, Manivasagam et al. **Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review**. Progress in materials science, v. 54, n. 3, p. 397-425, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

GHAFOOR, Aamir; HAY, Iain D.; REHM, Bernd HA. **Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture**. Applied and environmental microbiology, v. 77, n. 15, p. 5238-5246, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

GIEHL, Anderson et al. **Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes**. Plants, v. 12, n. 14, p. 2688, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants12142688>>. Acesso em 06 jul. 2024.

GOMES, Daniela et al. **Yeast synthetic biology approaches for the production of valuable polyphenolic compounds. In: Synthetic biology of yeasts: Tools and applications**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 119-156. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-89680-5_5>. Acesso em: 09 mar. 2024.

GÓMEZ-MEJÍA, Esther et al. **Determination of phenolic compounds in residual brewing yeast using matrix solid-phase dispersion extraction assisted by titanium dioxide nanoparticles**. Journal of Chromatography A, v. 1601, p. 255-265,

2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.009>>. Acesso em: 02 jul. 2024.

GONDIL, Vijay Singh; SUBHADRA, Bindu. **Biofilms and their role on diseases**. BMC microbiology, v. 23, n. 1, p. 203, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-023-02954-2>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. **Precipitation of DNA with Ethanol. Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27934690/>>. Acesso em: 12 jul. 2024.

GREEN, MR, Sambrook J. **Rapid Isolation of Yeast DNA**. Cold Spring Harb Protoc. 2018 Jun 1;2018(6). Disponível em: <doi: 10.1101/pdb.prot093542. PMID: 29858334>. Acesso em: 06 jul. 2024.

GRIZA, Sandro et al. **Microstructure and mechanical properties of hot rolled TiNbSn alloys**. Materials & Design (1980-2015), v. 56, p. 200-208, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2013.10.067>>. Acesso em: 06 abril. 2024.

GUINDON, Stéphane et al. **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0**. Systematic biology, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

GÜNAL-KÖROĞLU, Deniz et al. **Encapsulation of hydrophobic compounds in yeast cells: methods, characterization, and applications**. Exploration of Foods and Foodomics, v. 2, p. 252-274, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.37349/eff.2024.00037>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

GUPTA, Shubhpriya et al. **A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi**. Biotechnology advances, v. 39, p. 107462, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975019301624>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts**. Archives of biochemistry and biophysics, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3010861/>>. Acesso em: 05 jul. 2024.

HANCOCK, Robert EW; SPEERT, David P. **Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment**. Drug resistance updates, v. 3, n. 4, p. 247-255, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

HAPALA, Ivan et al. **Yeast membranes and cell wall: from basics to applications**. Current Genetics, v. 59, p. 167-169, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00294-013-0408-8>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

- HEYMANN, Felix et al. **Polypropylene mesh implantation for hernia repair causes myeloid cell-driven persistent inflammation.** JCI insight, v. 4, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/jci.insight.123862>>. Acesso em: 16 mar. 2024.
- HOF, Herbert. ***Rhodotorula* spp. in the gut—foe or friend?** GMS Infectious Diseases, v. 7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3205/id000042>>. Acesso em: 18 jul. 2024.
- HONG, Duck Jin et al. **Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*.** Infection & chemotherapy, v. 47, n. 2, p. 81, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>>. Acesso em: 18 mar. 2024.
- HONG, Ji-Young et al. **Production of β -glucan, glutathione, and glutathione derivatives by probiotic *Saccharomyces cerevisiae* isolated from cucumber jangajji.** LWT, v. 100, p. 114-118, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.048>>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- HOULDSWORTH, Annwyne. **Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: A review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants.** Brain Communications, p. fcad356, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad356>>. Acesso em: 16 mar. 2024.
- HU, Xue et al. **The anti-tumor effects of p-coumaric acid on melanoma A375 and B16 cells.** Frontiers in Oncology, v. 10, p. 558414, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.558414>>. Acesso em: 27 jun. 2024.
- HYRSLOVA, Ivana et al. **In vitro digestion and characterization of selenized *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* and probiotic *Saccharomyces boulardii*.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v. 83, p. 127402, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2024.127402>>. Acesso em: 16 mar. 2024.
- IGNEA, Codruta et al. **Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 113, n. 13, p. 3681-3686, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1523787113>>. Acesso em: 16 mar. 2024.
- IÑIGUEZ-MORENO, Maricarmen et al. **Sodium alginate coatings added with *Meyerozyma caribbica*: Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass).** Postharvest Biology and Technology, v. 163, p. 111123, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111123>>. Acesso em: 13 jul. 2024.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. **2022.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – **INCA. 2023a**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/tabagismo>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – **INCA. 2023b**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>>. Acesso em: 07 jun. 2024.

JANG, Mi Gyeong; KO, Hee Chul; KIM, Se-Jae. **Effects of p-coumaric acid on microRNA expression profiles in SNU-16 human gastric cancer cells**. *Genes & genomics*, v. 42, p. 817-825, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13258-020-00944-6>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

JENNINGS, Laura K. et al. **Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 36, p. 11353-11358, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>>. Acesso em: 04 mar. 2024.

JOMOVA, Klaudia et al. **Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging**. *Archives of toxicology*, v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>>. Acesso em: 04 jun. 2024.

JUNG, Hyun-Do. **Titanium and Its alloys for biomedical applications**. *Metals*, v. 11, n. 12, p. 1945, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/met11121945>>. Acesso em: 04 mar. 2024.

JURADO-MARTÍN, Irene; SAINZ-MEJÍAS, Maite; MCCLEAN, Siobhán. ***Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors**. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22063128>>. Acesso em: 04 mar. 2024.

KALITA, Samar Jyoti et al. **Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling**. *Materials Science and Engineering: C*, v. 23, n. 5, p. 611-620, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00052-3)>. Acesso em: 16 mar. 2024.

KHAN, Fahad Saleem Ahmed et al. **Functionalized multi-walled carbon nanotubes and hydroxyapatite nanorods reinforced with polypropylene for biomedical application**. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 843, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80767-3>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

KILIC, Tugba; BALI, Elif Burcu. **Biofilm control strategies in the light of biofilm-forming microorganisms**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 5, p. 131, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03584-6>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

KLEINWÄCHTER, Isabel S. et al. **The bacteriostatic activity of 2-phenylethanol derivatives correlates with membrane binding affinity**. *Membranes*, v. 11, n. 4, p.

254, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/membranes11040254>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

KONG, Min et al. **Functional identification of glutamate cysteine ligase and glutathione synthetase in the marine yeast *Rhodospiridium diobovatum***. The Science of Nature, v. 105, p. 1-9, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00114-017-1520-2>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

KOUL, Bhupendra; YAKOOB, Mohammad; SHAH, Maulin P. **Agricultural waste management strategies for environmental sustainability**. Environmental Research, v. 206, p. 112285, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112285>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

LAMBERT, Marie-Laurence et al. **Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study**. The Lancet infectious diseases, v. 11, n. 1, p. 30-38, 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70258-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70258-9)>. Acesso em: 09 mar. 2024.

LEE, Ji-Young et al. **Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa***. Scientific reports, v. 6, n. 1, p. 25543, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep25543>>. Acesso em: 09 mar. 2024.

LEFORT, Vincent; LONGUEVILLE, Jean-Emmanuel; GASCUEL, Olivier. **SMS: smart model selection in PhyML**. Molecular biology and evolution, v. 34, n. 9, p. 2422-2424, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

LEID, Jeff G. **Bacterial biofilms resist key host defenses**. Microbe, v. 4, n. 2, p. 66-70, 2009. Disponível em: <http://www.antimicrobe.org/history/Microbe_bacterial%20Biofilms%20resist%20Key%20host%20defenses.pdf>. Acesso em: 09 mar. 2024.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. **Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation**. Nucleic acids research, v. 49, n. W1, p. W293-W296, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

LEZOUL, Nour El Houda et al. **Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants**. Molecules, v. 25, n. 20, p. 4672, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25204672>>. Acesso em: 04 mar. 2024.

LI, Yunfeng et al. **Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract**. Food chemistry, v. 96, n. 2, p. 254-260, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>>. Acesso em: 11 mar. 2024.

LI, Kexin et al. **The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression.** *Cells*, v. 13, n. 5, p. 441, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells13050441>>. Acesso em: 04 jun. 2024.

LISTER, Philip D.; WOLTER, Daniel J.; HANSON, Nancy D. **Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms.** *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>>. Acesso em: 11 mar. 2024.

LIU, Dan et al. **Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review.** *Innovative food science & emerging technologies*, v. 36, p. 181-192, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>>. Acesso em: 02 jul. 2024.

LIU, Feixiang et al. **Metabolic engineering of oleaginous yeast in the lipogenic phase enhances production of nervonic acid.** *Metabolic Engineering*, v. 80, p. 193-206, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.10.001>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

LIU, Wenhan et al. **Adjustment of impact phenolic compounds, antioxidant activity and aroma profile in Cabernet Sauvignon wine by mixed fermentation of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*.** *Food Chemistry: X*, v. 18, p. 100685, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100685>>. Acesso em: 02 jul. 2024.

LIU, Yuzhong et al. **Complete biosynthesis of QS-21 in engineered yeast.** *Nature*, p. 1-8, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07345-9>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

LOU, Zaixiang et al. **Metabolomics-based screening of biofilm-inhibitory compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from burdock leaf.** *Molecules*, v. 20, n. 9, p. 16266-16277, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules200916266>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

MACÊDO, Elvira de Lourdes Chaves et al. **Yeasts from fermented Brazilian fruits as biotechnological tools for increasing phenolics bioaccessibility and improving the volatile profile in derived pulps.** *Food Chemistry*, v. 401, p. 134200, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134200>>. Acesso em: 01 jul. 2024.

MACDOUGALL, Conan et al. ***Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and fluoroquinolone use.** *Emerging infectious diseases*, v. 11, n. 8, p. 1197, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1108.050116>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

MAFI, Farnoosh et al. **Improvement in skeletal muscle strength and plasma levels of follistatin and myostatin induced by an 8-week resistance training and epicatechin supplementation in sarcopenic older adults.** *Journal of aging and*

physical activity, v. 27, n. 3, p. 384-391, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30299198/>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

MANDAJI, Carolina Marques; DA SILVA PENA, Rosinelson; CHISTÉ, Renan Campos. **Encapsulation of bioactive compounds extracted from plants of genus *Hibiscus*: A review of selected techniques and applications**. Food Research International, v. 151, p. 110820, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110820>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

MANGANYI, Madira C. et al. **Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides***. South African Journal of Botany, v. 116, p. 192-199, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.016>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

MAO, Wenfu; SCHULER, Mary A.; BERENBAUM, May R. **Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera***. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 22, p. 8842-8846, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1303884110>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

MARIN, Elia; LANZUTTI, Alex. **Biomedical Applications of Titanium Alloys: A Comprehensive Review**. Materials, v. 17, n. 1, p. 114, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ma17010114>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

MASTERSON, Kevin et al. **Synergy Assessment of Four Antimicrobial Bioactive Compounds for the Combinational Treatment of Bacterial Pathogens**. Biomedicines, v. 11, n. 8, p. 2216, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082216>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

MATUSIEWICZ, Magdalena et al. **Effect of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass with increased kynurenic acid content on selected metabolic indicators in mice**. PeerJ, v. 11, p. e15833, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.15833>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

MAURICE, Nicholas M.; BEDI, Brahmchetna; SADIKOT, Ruxana T. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections**. American journal of respiratory cell and molecular biology, v. 58, n. 4, p. 428-439, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

MCFARLAND, Lynne V. et al. **A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease**. Jama, v. 271, n. 24, p. 1913-1918, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.1994.03510480037031>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

MESCHER, Anthony L. **Junqueira's basic histology: text and atlas**. 13th ed. McGraw-Hill Lange, 2013.

MESCHER, Anthony L. **Junqueira's basic histology: Text and atlas**. 14th ed. McGraw-Hill Education, 2016.

MODESTO, Helen R. et al. **Activated carbon production from industrial yeast residue to boost up circular bioeconomy**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, p. 24694-24705, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-020-10458-z>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

MONEY, Nicholas P. **A ascensão da levedura: como um simples fungo moldou nossa civilização**. SciELO-Editora da Unicamp, 2021.

MORADALI, Fata M.; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. ***Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence**. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 39, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

NANDY, Subir Kumar; SRIVASTAVA, R. K. **A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications**. *Microbiological research*, v. 207, p. 83-90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

NARDI, Regina Maria Drummond. **Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii***. *RBM*, v. 62, n. 94, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Maria-Neves-8/publication/295748244_Comparison_of_six_probiotic_products_containing_Saccharomyces_boulardii/links/5da855a54585159bc3d591f4/Comparison-of-six-probiotic-products-containing-Saccharomyces-boulardii.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2024.

NATHWANI, Dilip et al. **Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis**. *Antimicrobial resistance and infection control*, v. 3, p. 1-16, 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-3-32>>. Acesso em: 09 mar. 2024.

NETT, Ryan. **Vaccine-enhancing plant extract could be mass produced in yeast**. 2024. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41586-024-01210-5#ref-CR2>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. **Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019**. *Journal of natural products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

NG, Neville S.; OOI, Lezanne. **A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization**. *Bio-protocol*, v. 11, n. 1, p. e3877-e3877, 2021. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.21769/BioProtoc.3877>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

NICHOLS, M. et al. **Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetin: Activation of convergent mitochondrial signaling pathways**. *Neuroscience*, v. 308, p. 75-94, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.012>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

OFFEI, Benjamin et al. **Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii***. *Genome research*, v. 29, n. 9, p. 1478-1494, 2019. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.243147.118>>. Acesso em: 05 jul. 2024.

OJO, Abidemi Oluranti. **An overview of lignocellulose and its biotechnological importance in high-value product production**. *Fermentation*, v. 9, n. 11, p. 990, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation9110990>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

OLIVEIRA, Ana Sofia et al. **Spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a potential source of bioactive peptides: an overview**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 208, p. 1116-1126, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.094>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

OLSEN, I. **Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 34, p. 877-886, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>>. Acesso em: 19 mar. 2024.

ORENTAITE, Irma et al. **K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS yeast research*, v. 16, n. 2, p. fow003, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Uma Saúde**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA MUNDIAL DE SAÚDE (OPAS, 2020). **Câncer**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 13 jul. 2024.

PESCHEL, Wieland et al. **An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes**. *Food Chemistry*, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.033>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

PINKSTON, Rakeysha et al. **Cell-specific toxicity of short-term JUUL aerosol exposure to human bronchial epithelial cells and murine macrophages exposed at the air-liquid interface**. *Respiratory research*, v. 21, p. 1-15, 2020. Disponível em: < >. Acesso em: 27 jun. 2024.

POKHREL, Aawaz R. et al. **The biophysical basis of bacterial colony growth**. *Nature Physics*, p. 1-9, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41567-024-02572-3>>. Acesso em: 30 julho. 2024.

POOLE, Keith. ***Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max.** *Frontiers in microbiology*, v. 2, p. 65, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

POOLE, Keith. **Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria.** *Trends in microbiology*, v. 20, n. 5, p. 227-234, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.02.004>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

POTRON, Anais; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. **Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology.** *International journal of antimicrobial agents*, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

PORICHHA, Gaurav Kumar et al. **Crop residue management in India: Stubble burning vs. other utilizations including bioenergy.** *Energies*, v. 14, n. 14, p. 4281, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/en14144281>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

QI, Weidong et al. **Quercetin: its antioxidant mechanism, antibacterial properties and potential application in prevention and control of toxipathy.** *Molecules*, v. 27, n. 19, p. 6545, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27196545>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

RAJ, Reshmi et al. **Surface modification of polypropylene mesh with a porcine cholecystic extracellular matrix hydrogel for mitigating host tissue reaction.** *ACS Applied Bio Materials*, v. 4, n. 4, p. 3304-3319, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsbm.0c01627>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

RIBEIRO, Renata MMGP et al. **Synergistic effects of stirring and aeration rate on carotenoid production in yeast *Rhodotorula toruloides* CCT 7815 envisioning their application as soap additives.** *Fermentation*, v. 9, n. 9, p. 828, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation9090828>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

RIQUELME, Sebastián A. et al. ***Pseudomonas aeruginosa* utilizes host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation.** *Cell metabolism*, v. 31, n. 6, p. 1091-1106. e6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.017>>. Acesso em: 03 mar. 2024.

RODRIGUEZ-NARANJO, María Isabel et al. **Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions.** *Journal of Pineal Research*, v. 53, n. 3, p. 219-224, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00990.x>>. Acesso em: 03 jul. 2024.

RÖMLING, Ute; BALSALOBRE, Carlos. **Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies.** *Journal of internal medicine*, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/joim.12004>>. Acesso em: 01 abr. 2024.

ROQUE, Laerti Reis et al. **Extração líquido-líquido: Uma alternativa promissora para remoção de inibidores da fermentação de pentoses.** Fuel , v. 242, p. 775-787, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.130>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

RUSSOTTO, Vincenzo et al. **Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit.** Journal of intensive care, v. 3, p. 1-8, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40560-015-0120-5>>. Acesso em: 01 abr. 2024.

SALES, Arthur Pereira. **Agricultural frontiers and environment: a systematic literature review and research agenda for Emerging Countries.** Environment, Development and Sustainability, p. 1-26, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10668-023-04030-1>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

SAN MARTIN, David et al. **Valorisation of brewer's spent yeasts' hydrolysates as high-value bioactive molecules.** Sustainability, v. 13, n. 12, p. 6520, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su13126520>>. Acesso em: 01 jul. 2024.

SANTOS, Lucielen Oliveira et al. **Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and perspectives.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 106, n. 5-6, p. 1879-1894, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-11826-0>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

SARRAF, Masoud et al. **A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications.** Bio-design and Manufacturing, p. 1-25, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42242-021-00170-3>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

SEN, Swastik; MANSELL, Thomas J. **Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential.** Fungal Genetics and Biology, v. 137, p. 103333, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

SERETI, Fani et al. **Carotenoids production by *Rhodospiridium paludigenum* yeasts: characterization of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties.** Journal of Biotechnology, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.03.011>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

SHARMA, Parvarish et al. **Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer.** Chemico-biological interactions, v. 309, p. 108720, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.033>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SILVA, Izabella Thaís da et al. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba).** 2009. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/92860>>. Acesso em: 13 jul. 2024.

SILVA, Pedro Garcia Pereira et al. **Sustainable approach to recover β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* grown in a stirred-tank bioreactor under the influence of magnetic fields.** Bioresource Technology, v. 390, p. 129906, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129906>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

SINELI, Pedro E. et al. **Bioconversion of sugarcane molasses and waste glycerol on single cell oils for biodiesel by the red yeast *Rhodotorula glutinis* R4 from Antarctica.** Energy Conversion and Management: X, v. 16, p. 100331, 2022. Energy Convers. Manag. X 2022, 16, 100331. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100331>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SINGH, Bhaskar et al. **Emerging feedstocks & clean technologies for lignocellulosic biofuel.** Frontiers in Energy Research, v. 10, p. 917081, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.917081>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

SINGHA, Krishanu et al. **Molecular exposition of broad-spectrum antibacterial efficacy by p-coumaric acid from an edible mushroom *Termitomyces heimii*: in vitro and in silico approach.** Systems Microbiology and Biomanufacturing, v. 3, n. 4, p. 750-764, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43393-022-00146-z>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SINHA, Sweta et al. **Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-breast cancer properties unraveled in yeast carotenoids produced via cost-effective fermentation technique utilizing waste hydrolysate.** Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 1088477, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1088477>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

SKLIROU, Aimilia D. et al. **Hexapeptide-11 is a novel modulator of the proteostasis network in human diploid fibroblasts.** Redox Biology, v. 5, p. 205-215, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.010>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

STALIDZANS, Egils; DACE, Elina. **Sustainable metabolic engineering for sustainability optimisation of industrial biotechnology.** Computational and Structural Biotechnology Journal, v. 19, p. 4770-4776, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.034>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

STALIKAS, Constantine D. **Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.** Journal of separation science, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

SITAREK, Przemysław et al. **Potential synergistic action of bioactive compounds from plant extracts against skin infecting microorganisms.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 14, p. 5105, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms21145105>>. Acesso em: 01 jul. 2024.

STRATEVA, Tanya; YORDANOV, Daniel. ***Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance**. Journal of medical microbiology, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

STREMPEL, Nikola et al. **Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa***. PloS one, v. 8, n. 12, p. e82240, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082240>>. Acesso em: 01 mar. 2024.

SUN, Fu; CHEN, Minpeng; CHEN, Jining. **Integrated Management of Source Water Quantity and Quality for Human Health in a Changing World**. In: Encyclopedia of Environmental Health. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 254–265. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00286-5>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

SUN, Jingjing; DENG, Ziqing; YAN, Aixin. **Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations**. Biochemical and biophysical research communications, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>>. Acesso em: 08 mar. 2024.

TADIOTO, Viviani et al. **Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review**. Fermentation, v. 9, n. 4, p. 363, 2023a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation9040363>>. Acesso em: 02 jul. 2024.

TADIOTO, Viviani et al. **Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis**. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 46, n. 8, p. 1133-1145, 2023b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-022-02812-x>>. Acesso em: 05 jul. 2024.

TAPPA, Karthik; JAMMALAMADAKA, Udayabhanu. **Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques**. Journal of functional biomaterials, v. 9, n. 1, p. 17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10856-023-06765-9>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

TEHRANI, Hadi et al. **The prevalence of electronic cigarettes vaping globally: a systematic review and meta-analysis**. Archives of Public Health, v. 80, n. 1, p. 240, 2022. Disponível em: <>. Acesso em: 27 jun. 2024.

TEHAMI, Waf'aa et al. **New insights into the anticancer effects of p-coumaric acid: focus on colorectal cancer**. Dose-Response, v. 21, n. 1, p. 15593258221150704, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/15593258221150704>>. Acesso em: 27 jun. 2024.

THYAB GDDOA AL-SAHLANY, Shayma et al. **Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced by *Saccharomyces cerevisiae***. Foods, v. 9, n. 3, p. 324, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods9030324>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

TONINI, Stefano et al. **Apple Blossom Agricultural Residues as a Sustainable Source of Bioactive Peptides through Microbial Fermentation Bioprocessing.** *Antioxidants*, v. 13, n. 7, p. 837, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox13070837>>. Acesso em: 18 jul. 2024.

TRUBIANO, Jason A.; PADIGLIONE, Alexander A. **Nosocomial infections in the intensive care unit.** *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, v. 16, n. 12, p. 598-602, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.09.010>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

TURNER, Keith H. et al. **Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection.** *PLoS genetics*, v. 10, n. 7, p. e1004518, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004518>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

UBIYVOVK, Vira M. et al. **Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1.** *BMC biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011. Disponível em: <<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-11-8>>. Acesso em: 03 jul. 2024.

ULU, Ahmet et al. **Chitosan/polypropylene glycol hydrogel composite film designed with TiO₂ nanoparticles: A promising scaffold of biomedical applications.** *International journal of biological macromolecules*, v. 163, p. 529-540, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.015>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening.** *Nature protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2006.179>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

WALKER, Graeme M. **Yeast physiology and biotechnology.** John Wiley & Sons, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00438.x>>. Acesso em: 02 jul. 2024.

WANG, Lin et al. **Isolation and characterization of *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3, a novel riboflavin-producing marine yeast.** *Microbiological research*, v. 163, n. 3, p. 255-266, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.12.001>>. Acesso em: 04 jul. 2024.

WANG, Jun-Feng et al. **Vaccinols J–S, ten new salicyloid derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Pestalotiopsis vaccinii*.** *Fitoterapia*, v. 120, p. 164-170, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.013>>. Acesso em: 09 jul. 2024.

WANG, Panlin et al. **Degradation of polypropylene by the *Pseudomonas aeruginosa* strains LICME WZH-4 and WGH-6.** *Journal of Polymers and the*

Environment, v. 30, n. 9, p. 3949-3958, 2022b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-022-02480-8>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

WANG, Yingsong; BIAN, Zeran; WANG, Yan. **Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 106, n. 19, p. 6365-6381, 2022a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12150-3>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

WANG, Zhenshuo et al. **Management of blue mold (*Penicillium italicum*) on mandarin fruit with a combination of the yeast, *Meyerozyma guilliermondii* and an alginate oligosaccharide**. Biological Control, v. 152, p. 104451, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104451>>. Acesso em: 03 jul. 2024.

WHITE, Thomas J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. PCR protocols: a guide to methods and applications, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

WHO. World Health Organization. **Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 09 jul 2024.

WHO. World Health Organization. **WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health**. 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>>. Acesso em: 29 jul 2024.

WRÓBEL-KWIATKOWSKA, Magdalena et al. **An efficient method for production of kynurenic acid by *Yarrowia lipolytica***. Yeast, v. 37, n. 9-10, p. 541-547, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/yea.3469>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

WIESSNER, Andreas et al. **In vivo biofilm formation on novel PEEK, titanium, and zirconia implant abutment materials**. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 2, p. 1779, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms24021779>>. Acesso em: 06 abr. 2024.

WILLIAMS, David Franklyn. **Biocompatibility of clinical implant materials**. (No Title), 1981. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:135936198>>. Acesso em: 06 abr. 2024.

WINSTANLEY, Craig; O'BRIEN, Siobhan; BROCKHURST, Michael A. ***Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections**. Trends in microbiology, v. 24, n. 5, p. 327-337, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

WU, Xiujuan et al. ***Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors**. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 294, n. 1, p. G295-G306, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00173.2007>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

XU, Jin et al. **Effects of novel cellulase (Cel 906) and probiotic yeast fermentation on antioxidant and anti-inflammatory activities of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*)**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 1006316, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1006316>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

XUE, Si-Jia et al. **Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications**. *Critical reviews in biotechnology*, v. 38, n. 7, p. 1049-1060, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>>. Acesso em: 17 jun. 2024.

YE, Victor M.; BHATIA, Sujata K. **Metabolic engineering for the production of clinically important molecules: Omega-3 fatty acids, artemisinin, and taxol**. *Biotechnology journal*, v. 7, n. 1, p. 20-33, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/biot.201100289>>. Acesso em: 01 jun. 2024.

ZHANG, Peng et al. **Investigation on the temperature control accuracy of a print head for extrusion 3D printing and its improved design**. *Biomedicines*, v. 10, n. 6, p. 1233, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines10061233>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

ZHAO, Xin-Ru et al. **De novo synthesis of nervonic acid and optimization of metabolic regulation by *Yarrowia lipolytica***. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 10, n. 1, p. 70, 2023a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-023-00689-6>>. Acesso em: 16 mar. 2024.

ZHAO, Yongxia et al. **Cancer metabolism: the role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells**. *Metabolites*, v. 13, n. 7, p. 796, 2023b. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/metabo13070796>>. Acesso em: 04 jun. 2024.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM AND AGAINST YEASTS IN THE ONE HEALTH CONTEXT: A COMPREHENSIVE REVIEW



fermentation



Review

Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review

Viviani Tadioto ^{1,2,3} , Anderson Giehl ^{1,2} , Rafael Dorighello Cadamuro ^{1,3}, Iara Zanella Guterres ^{3,4}, Angela Alves dos Santos ⁵, Stefany Kell Bressan ², Larissa Werlang ², Boris U. Stambuk ^{1,5} , Gislaine Fongaro ^{1,3}, Izabella Thaís Silva ^{1,3,4} and Sérgio Luiz Alves, Jr. ^{1,2,*}

¹ Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

² Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó 89815-899, SC, Brazil

³ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

⁴ Graduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

⁵ Laboratory of Yeast Molecular Biology and Biotechnology, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

* Correspondence: slalvesjr@uffs.edu.br

Abstract: Yeasts are the most used microorganisms for biotechnological purposes. Although they have been mainly recognized for their application in the beverage and bioethanol industries, these microorganisms can be efficiently employed in pharmaceutical and food production companies. In these industrial sectors, yeasts are highly desirable for their capacity to produce bioactive compounds from simple substrates, including wastes. In this review, we present the state of the art of bioactive compound production in microbial cell factories and analyze the avenues to increase the productivity of these molecules, which benefit human and environmental health. The article addresses their vast biological activities, from preventing to treating human diseases and from pre to postharvest control on agroindustrial streams. Furthermore, different yeast species, genetically engineered or not, are herein presented not only as biofactories of the referred to compounds but also as their targets. This comprehensive analysis of the literature points out the significant roles of biodiversity, bioprospection, and genome editing tools on the microbial production of bioactive compounds and reveals the value of these approaches from the one health perspective.

Keywords: anticancer; antifungal; anti-inflammatory; antimicrobial; antioxidant; antiviral; biocontrol; ecological food production; killer toxins; volatile compounds



Citation: Tadioto, V.; Giehl, A.; Cadamuro, R.D.; Guterres, I.Z.; dos Santos, A.A.; Bressan, S.K.; Werlang, L.; Stambuk, B.U.; Fongaro, G.; Silva, I.T.; et al. Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. *Fermentation* **2023**, *9*, 363. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040363>

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO: BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INSIGHTS INTO FUNGUS-PLANT INTERACTIONS FOR ENHANCED SUSTAINABLE AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL PROCESSES



Review

Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes

Anderson Giehl ^{1,2}, Angela Alves dos Santos ¹, Rafael Dorighello Cadamuro ^{2,3}, Viviani Tadioto ^{1,2,3}, Iara Zanella Guterres ^{3,4}, Isabella Dai Prá Zuchi ^{3,4}, Gabriel do Amaral Minussi ^{1,5}, Gislaïne Fongaro ^{2,3}, Izabella Thais Silva ^{2,3,4} and Sergio Luiz Alves, Jr. ^{1,2,5,*}

¹ Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89815-899, SC, Brazil

² Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

³ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

⁴ Graduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

⁵ Graduate Program in Environment and Sustainable Technologies, Federal University of Fronteira Sul, Cerro Largo 97900-000, RS, Brazil

* Correspondence: slalvesjr@uffs.edu.br

Abstract: The literature is full of studies reporting environmental and health issues related to using traditional pesticides in food production and storage. Fortunately, alternatives have arisen in the last few decades, showing that organic agriculture is possible and economically feasible. And in this scenario, fungi may be helpful. In the natural environment, when associated with plants, these microorganisms offer plant-growth-promoting molecules, facilitate plant nutrient uptake, and antagonize phytopathogens. It is true that fungi can also be phytopathogenic, but even they can benefit agriculture in some way—since pathogenicity is species-specific, these fungi are shown to be useful against weeds (as bioherbicides). Finally, plant-associated yeasts and molds are natural biofactories, and the metabolites they produce while dwelling in leaves, flowers, roots, or the rhizosphere have the potential to be employed in different industrial activities. By addressing all these subjects, this manuscript comprehensively reviews the biotechnological uses of plant-associated fungi and, in addition, aims to sensitize academics, researchers, and investors to new alternatives for healthier and more environmentally friendly production processes.

Keywords: biocontrol; bioherbicide; mold; phytohormone; phytopathogen; plant-growth promoter; yeast



Citation: Giehl, A.; dos Santos, A.A.; Cadamuro, R.D.; Tadioto, V.; Guterres, I.Z.; Prá Zuchi, I.D.; Minussi, G.d.A.; Fongaro, G.; Silva, I.T.; Alves, S.L., Jr. Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes. *Plants* **2023**, *12*, 2688. <https://doi.org/10.3390/plants12142688>

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: ANALYSIS OF THE HOLOCELLULOLYTIC AND FERMENTATIVE POTENTIALS OF YEASTS ISOLATED FROM THE GUT OF SPODOPTERA FRUGIPERDA LARVAE

BioEnergy Research (2023) 16:2046–2057
<https://doi.org/10.1007/s12155-023-10616-4>



Analysis of the Holocellulytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae

Maria L. R. Albarello^{1,2,3} · Anderson Giehl³ · Viviani Tadioto^{1,3} · Angela A. dos Santos^{2,3} · Letícia M. Milani³ · Jean C. S. Bristot³ · Marco A. Tramontin⁴ · Helen Treichel^{1,5} · Oderlei Bernardi⁶ · Boris U. Stambuk^{1,2} · Sérgio L. Alves Jr.^{1,3}

Received: 26 January 2023 / Accepted: 23 May 2023 / Published online: 2 June 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Despite recent improvements, second-generation (2G) biorefineries still have challenges to overcome, especially regarding cellulose and xylan hydrolysis and xylose fermentation. Hydrolases account for a high percentage of the process' total cost, and industrial yeasts may not assimilate xylose properly. In this sense, prospecting microorganisms that can both metabolize this sugar and hydrolyze cellulose and xylan may lead to significant advances in 2G processes. Since the gut microbiota of herbivorous insects has proven to be the major player in their lignocellulose digestion, yeasts were isolated from the gut of *Spodoptera frugiperda* larvae, and their cellulolytic, xylanolytic, and xylose-assimilating capacity were analyzed. From a hundred larvae guts, forty-six yeasts were selected for their growth capacity in xylose-containing media. Fourteen strains were able to hydrolyze cellulose, and three showed xylanolytic activity. Two strains, taxonomically identified as *Papiliotrema laurentii* and *Meyerozyma caribbica*, stood out with the highest cellular biomass yield and productivity when submitted to a high-throughput microscale growth analysis under different culture conditions (varying pH and sugar concentration). While the *P. laurentii* strain displayed the highest xylanolytic activity (205.48 U/mL) and an intermediate cellulolytic capacity (31.25 U/mL), the *M. caribbica* strain showed, besides cellulase activity (37.46 U/mL), high ethanol and xylitol yields (0.36 g_{ethanol}/g_{glucose} and 0.35 g_{xylitol}/g_{xylose}, respectively) in media with the most common fermentation inhibitors in 2G bioprocesses. Through a Central Composite Rotatable Design, the optimized condition for the simultaneous production of ethanol and xylitol was found to be in a 55–85 g/L range of sugar concentration and between pH values of 6.0 to 8.5. Also, this experimental design analysis allowed the validation of empiric-coded models. These results indicate the high biotechnological potential of prospecting yeasts in *S. frugiperda* guts.

Keywords *Papiliotrema laurentii* · *Meyerozyma caribbica* · Ethanol · Xylitol · Xylose

✉ Sérgio L. Alves Jr.
 slalvesjr@uffs.edu.br

¹ Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó, Rodovia SC 484, Km 2, 89815-899, Bairro Fronteira Sul, Chapecó, SC, Brazil

⁴ Laboratory of Agricultural Entomology, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil

⁵ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Campus Erechim, Erechim, RS, Brazil

⁶ Department of Plant Protection, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO: FUNGUS-BASED BIOHERBICIDES ON CIRCULAR ECONOMY

Bioprocess and Biosystems Engineering (2023) 46:1729–1754
<https://doi.org/10.1007/s00449-023-02926-w>

CRITICAL REVIEW



Fungus-based bioherbicides on circular economy

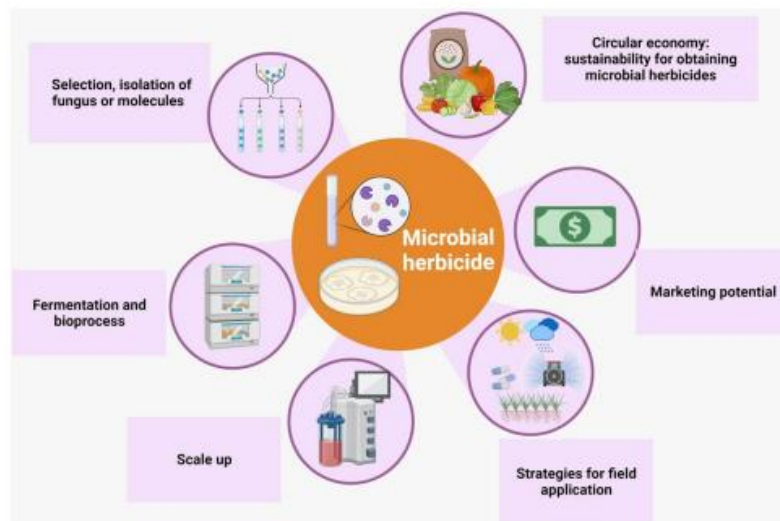
Aline Frumi Camargo^{1,2} · Charline Bonatto² · Thamarys Scapini³ · Natalia Klanovicz⁴ · Viviani Tadioto¹ · Rafael Dorighello Cadamuro¹ · Suzana Fátima Bazoti⁵ · Simone Kubeneck² · William Michelin⁶ · Francisco Wilson Reichert Júnior⁷ · Altemir José Mossi⁸ · Sérgio Luiz Alves Júnior⁹ · Gislaine Fongaro¹ · Helen Treichel^{1,2}

Received: 1 August 2023 / Accepted: 6 September 2023 / Published online: 25 September 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

This review aimed to show that bioherbicides are possible in organic agriculture as natural compounds from fungi and metabolites produced by them. It is discussed that new formulations must be developed to improve field stability and enable the commercialization of microbial herbicides. Due to these bottlenecks, it is crucial to advance the bioprocesses behind the formulation and fermentation of bio-based herbicides, scaling up, strategies for field application, and the potential of bioherbicides in the global market. In this sense, it proposed insights for modern agriculture based on sustainable development and circular economy, precisely the formulation, scale-up, and field application of microbial bioherbicides.

Graphical abstract



Keywords Bioherbicides · Secondary metabolites · Bioprocess · Production safety

✉ Helen Treichel
 helentreichel@gmail.com

¹ Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

² Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, Brazil

³ Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁴ Research Group in Advanced Oxidation Processes (AdOx), Department of Chemical Engineering, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁶ University of Contestado, Concórdia, Brazil

⁷ School of Agricultural Sciences, Innovation, and Business, Passo Fundo University, Passo Fundo, Brazil

⁸ Laboratory of Agroecology, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, Brazil

⁹ Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó, Brazil

APÊNDICE E – TRABALHO PUBLICADO NOS ANAIS DO I COBBIND



EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF YEAST CELL EXTRACTS

Viviani Tadioto^{1,2,3}, Angela Alves dos Santos¹, Anderson Giehl^{1,3}, Stéfany K. Bressan¹, Triciane T. Pereira¹, Miguel de A. de Oliveira^{3,4}, Aguinaldo R. Pinto^{3,4}, Gislaïne Fongaro^{2,3}, Izabella Thaís da Silva^{2,3} & Sérgio Luiz Alves Jr^{1,3}

¹Laboratory of Yeast Biochemistry (LabBioLev), Federal University of Fronteira Sul, Chapecó, SC, Brazil.

²Laboratory of Applied Virology Laboratory (LVA), Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³Postgraduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴Laboratory of Applied Immunology (LIA), Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

* Corresponding author's email: slalvesjr@uffs.edu.br

ABSTRACT

Yeasts play crucial roles in natural and industrial environments, being capable of generating bioactive metabolites that may benefit human, animal, and plant health. Yeast bioactive compounds influence biological processes and interactions. The ease of use of yeasts in fermentative processes makes them promising for industrial applications, but the lack of knowledge about their bioactive compounds limits their use. Therefore, this work evaluated intracellular extracts produced with five yeasts isolated from different environments of Brazilian biodiversity and a yeast widely used in the Brazilian industry (PE-02). The extracts were obtained with the solvents, hexane, ethyl acetate, and butanol. The aqueous phase was also used as fractionate. The extracts were evaluated *in vitro* for cytotoxicity in two mammalian cell lineages: the macrophage-derived RAW 264.7 and the fibroblast-derived VERO. Furthermore, antioxidant activity was tested in macrophages and their compounds were detected. The cell extracts of three wild yeast strains isolated from caterpillar and bee microbiotas showed promising antioxidant activity. In these extracts, the phenolic compound p-coumaric acid was found at concentrations varying from 0.66 to 0.156 mg/L. Our results thus suggest that yeasts from Brazilian microbiota exhibit significant potential for reducing reactive oxygen species.

Keywords: Intracellular metabolites. Macrophage. Bioactive Compounds. Biodiversity.

APÊNDICE F – CAPÍTULO PUBLICADO: BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE LEVEDURAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À SAÚDE

Capítulo 05

Bioprospecção de metabólitos de leveduras para fins biotecnológicos aplicados à saúde

DOI: 10.56041/9786599841859-5

DOS SANTOS, Angela Alves

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-8621-4311>

TADIOTO, Viviani

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-76285775>

GIEHL, Anderson

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-000252782436>

BRESSAN, Stéfany Kell

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0009-0000-9942-648X>

WERLANG, Larissa

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0009-0007-4750-8505>

OLIVEIRA, Camila Girardi

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0009-0003-7957-7426>

DINIZ, Mariana Da Costa

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-7692-9893>

PEREIRA, Triciane Tornai

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0009-0001-2572-9186>

SILVA, Izabella Thais

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>

FONGARO, Gislaine

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-000155963320>

ALVES, Sérgio Luiz Jr.*

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-7787-971X>

*Autor Correspondente: slavesjr@uffs.edu.br

ANEXO A – CERTIFICADO DE QUALIDADE DO CILINDRO DE TITÂNIO

rznris

do Brasil

Empresa Certificada:
ISO 13485
ISO 9001



CERTIFICADO DE QUALIDADE

N Certificado: 0277/2019 Nota Fiscal: 9183 N Pedido: 4919 N Pedido Cliente: E-mail de 06/02/2019 Data: 07/02/2019
N Certificado de Origem: 118818 Cliente: IMPLACIL DE BORTOLI MATERIAL ODONTOLOGICO LTDA Peso: 16,5 Corrida: H28193

Dados do Material		
Material	Especificação	Tolerância
Barra de Titânio Puro GR4 Diâmetro 5,50mm	ASTM F67 GR4 e ISO 5832-2	+ 0 / - 0,018
Tratamento Térmico	Observação	Diâmetro
RECOZIDO		5,494 mm
Comprimentos	Acabamento	
3.00.000mm	RETIFICADO BR	
	Composição Química	
°C	% Ti	% H
0,0630 %	99,4824 %	0,0016 %
%N	% Fe	% O
0,0030%	0,0600 %	0,3900 %
	Propriedades Mecânicas	
Lim. Resistência a Tração / Tensile Strength (MPa)	Limite de Escoamento / Yield Strength (MPa)	Alongamento / Elongation mínimo (%)
756,000 MPa	626,000 MPa	44,00 %
Red. de Área / Reduct on in area (%)		
56,00 %		
Tamanho de Grão / Grain Size	Metalografia	
10,00	ALPHA - CASE	
	NO ALPHA CASE	

Observações

Alguns dados foram extraídos do certificado de origem do fabricante da matéria prima.

Departamento da Garantia da Qualidade

Acnis do Brasil

Av. Iporanga, 340 - galpão 3 - Ronda Grande - Eden - Sorocaba - SP - Brasil - CEP 18086-602 - 55 15 3225.4044 - 55 15 3325.594
Site: www.bior-acnis.com.br