

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIELY CRISTINE DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS
NÃO-CONVENCIONAIS QUANTO AO CONSUMO DE ALFA-
TERPINEOL**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2020

MARIELY CRISTINE DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS
NÃO-CONVENCIONAIS QUANTO AO CONSUMO DE ALFA-
TERPINEOL**

**Selection and molecular characterization of non-conventional
yeasts for alpha-terpineol consumption**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof.^a Dr.^a Juliana Vitória Messias Bittencourt.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Elisabete Hiromi Hashimoto

PONTA GROSSA

2020



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa**



MARIELY CRISTINE DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS
QUANTO AO CONSUMO DE ALFA-TERPINEOL**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 15 de Outubro de 2020

Prof.a Juliana Vitoria Messias Bittencourt, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Alessandra Cristine Novak Sydney, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Elisabete Hiromi Hashimoto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Vania Aparecida Vicente, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/10/2020.

AGRADECIMENTOS

Uma página nunca seria o suficiente para agradecer a cada pessoa que contribuiu na minha jornada, principalmente acadêmica, durante esse período do mestrado. Mencionei brevemente apenas algumas pessoas, mas estendo meu sincero agradecimento à todas as pessoas que de alguma forma fizeram a diferença e me ajudaram a concluir esta etapa.

Primeiramente, agradeço a Deus, justo e benevolente sem o qual eu nada seria.

Às minhas orientadoras, Prof. Dra. Juliana Bittencourt e Prof. Dra. Elisabete Hashimoto por me guiarem com sabedoria e paciência, e me mostrarem novas alternativas, caminhos e pontos de vista que sozinha eu não seria capaz de enxergar. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos.

À UTFPR pela bolsa concedida para o financiamento desta pesquisa pelo período de 12 meses.

À minha mãe e irmã, pela paciência, companheirismo e incentivo durante toda a minha vivência acadêmica.

Aos meus web amigos e amigos de perto, que devido a situação atual também viraram amigos virtuais. Obrigada por compartilharem vivências e conselhos e descontraírem meus momentos menos iluminados. Especialmente agradeço à Nicoli pela ajuda com os softwares de texto, e a Mariana Camargo e Yohana que, assim como minha irmã, foram referências para mim na academia e pesquisa em humanas.

Não menos importante, agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório e mestrado: Mariana, que tem sido uma mentora importante na vida pessoal e na ciência, desde a minha iniciação científica; aos alunos de iniciação científica que frequentemente compartilharam trabalhos de laboratório comigo: Shelen, Arthur e Lucas, obrigada pelo companheirismo, descontração e por também me deixarem aprendizados que vou levar para a vida toda; e a Emellyn, que, como colega mestranda, compartilhou alegrias e frustrações inerentes à nossa jornada e sempre foi alguém com quem contar.

Às psicólogas Dra. Francielly e Dra. Juliana por me mostrarem novos caminhos quando acreditei que estava em ruas sem saída.

Ao Yoon Jeonghan que me mostrou o significado de perseverança e ao Qian Kun que me mostrou o valor do trabalho árduo, sendo ambos grande inspiração e fonte de motivação durante dias não tão fáceis.

Por fim, agradeço a todos que me encontraram e me auxiliaram nesse período, e conseqüentemente me ajudaram a me encontrar. Toda a ajuda, mesmo que aparentemente pequena, fez grande diferença ao final.

RESUMO

SANTOS, Mariely Cristine dos. **Seleção e caracterização molecular de leveduras não-convencionais quanto ao consumo de alfa-terpineol**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020).

Muitos micro-organismos são estudados em virtude da melhoria nas características organolépticas e tecnológicas que são capazes de conferir a uma grande variedade de alimentos e bebidas. As leveduras não-convencionais destacam-se por sua habilidade de utilização de diferentes rotas metabólicas, o que favorece a produção de biomoléculas que podem ser interessantes do ponto de vista biotecnológico. Desta maneira, a atual pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade de consumo de um composto terpênico, o α -terpineol, por leveduras não-convencionais depositadas no centro de coleções CMRP. Para isso, 23 leveduras não-convencionais e produtoras de aroma frutais foram selecionadas dentre as leveduras depositadas em uma das coleções integrantes do centro de coleções CMRP. Realizou-se a identificação molecular de cada uma delas. As linhagens, então, foram testadas quanto à sua tolerância ao α -terpineol, sendo cultivadas em caldo YM, em pH 5,0, por 48 h com adição de concentrações de 2,5 $\mu\text{L/mL}$, 5,0 $\mu\text{L/mL}$, 7,5 $\mu\text{L/mL}$ e 10,0 $\mu\text{L/mL}$ da mistura de α -terpineol e álcool etílico. As leveduras que apresentaram tolerância a alguma dessas concentrações foram cultivadas novamente, mas em meio mineral DP líquido, para avaliação de seu consumo de α -terpineol. O tempo de cultivo total foi de 48 h, e amostras foram coletadas a cada 12 horas de cultivo, inclusive no tempo inicial. Extraíram-se as amostras coletadas com diclorometano e os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada, utilizando tolueno:acetato de etila (93:7) como fase móvel e p-anisaldeído ácido sulfúrico como revelador. As características das manchas foram observadas e os valores de R_f foram calculados. Com a identificação molecular, revelou-se que 12 leveduras pertenciam a espécie *Clavispora lusitaniae*, 8 eram *Rhodotorula mucilaginosa* e 3 eram *Lodderomyces elongisporus*. Segundo a árvore filogenética, duas dessas linhagens (*C. lusitaniae* e *L. elongisporus*) apresentam maior proximidade genética entre si em relação à levedura *R. mucilaginosa*. Do total de 23 leveduras, 6 delas se mostraram tolerantes à concentração de 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de α -terpineol, sendo uma destas tolerante também à concentração de 10,0 $\mu\text{L/mL}$ mas somente durante 12 horas. As linhagens tolerantes foram identificadas como *C. lusitaniae* (n=1), *L. elongisporus* (n=2) e *R. mucilaginosa* (n=3). A levedura que aguentou a maior concentração, *R. mucilaginosa*, no entanto, resistiu apenas 12 h em todas as concentrações. Suspeita-se que seu mecanismo de defesa tenha sucumbido ao composto, que tenha havido degradação enzimática ou a produção de compostos tóxicos pela mesma linhagem ao consumir o α -terpineol. Durante a primeira análise de CCD, as amostras CMIB 46 (*R. mucilaginosa*) e CMIB 33 (*L. elongisporus*) apresentaram resultados potencialmente promissores, portanto, repetiu-se o processo de cultivo, coleta e análise para estas amostras. Com a segunda análise por CCD, obtiveram-se resultados inconclusivos para o consumo de α -terpineol pelas duas linhagens, principalmente pela baixa concentração das amostras, sugerindo-se futuramente o uso de técnicas auxiliares, como cromatografia gasosa

acoplada a espectrômetro de massas para detecção destes compostos com maior sensibilidade.

Palavras-chave: α -terpineol. Cromatografia em Camada Delgada. Identificação molecular. Leveduras não-convencionais. Leveduras produtoras de bioaromas.

ABSTRACT

SANTOS, Mariely Cristine dos. **Selection and molecular characterization of non-conventional yeasts for alpha-terpineol consumption**. 2020. 84 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology - Federal Technology University – Paraná, Ponta Grossa, 2020).

Many microbial species are acknowledged by their ability to provide distinct organoleptic properties to countless foods and drinks, especially alcoholic beverages. Non-conventional yeasts stand out in using different metabolic pathways to produce biomolecules that may be interesting from the biotechnological point of view. The present research aimed to analyze the potential consumption of a monoterpenic compound, α -terpineol, by non-conventional yeasts CMRP collection center. For this purpose, 23 fruity aroma-producing, non-conventional yeasts were selected from one of the collections belonging to the CMRP collection center. Thereafter, these strains were molecularly identified. Subsequently, the strains were tested for their tolerance to α -terpineol, by cultivating them in YM broth, at pH 5.0, for 48 h. Concentrations of 2.5 $\mu\text{L/mL}$, 5.0 $\mu\text{L/mL}$, 7.5 $\mu\text{L/mL}$ and 10.0 $\mu\text{L/mL}$ of a mixture of α -terpineol and ethyl alcohol were added in the broth. The yeasts that survived any of these concentrations were cultured again, but this time in mineral DP liquid culture medium. This technique aimed to assess their consumption of α -terpineol. The overall cultivation time was 48 h, however samples were collected every 12 hours of cultivation, including the initial time of 0 hour. The samples collected were extracted with dichloromethane and the extracts were analyzed by thin layer chromatography, using toluene: ethyl acetate (93:7) as a mobile phase and p-anisaldehyde sulfuric acid as stain for further visualization of the spots. The size, color and intensity of the spots were observed and the Rf values were calculated. The yeasts species were identified as *Clavispora lusitaniae*, being it 12 strains, *Rhodotorula mucilaginosa* with 8 strains and the last 3 strains were identified as *Lodderomyces elongisporus*. Furthermore, according to the phylogenetic tree, two of these strains (*C. lusitaniae* and *L. elongisporus*) have greater genetic proximity to each other than to the yeast *R. mucilaginosa*. From the 23 yeasts, 6 of them were shown to be tolerant to the concentration of 2.5 $\mu\text{L/mL}$ of α -terpineol, one of which also showed tolerance to the concentration of 10.0 $\mu\text{L/mL}$ for 12 hours. The tolerant strains were identified as *C. lusitaniae* (n = 1), *L. elongisporus* (n = 2) and *R. mucilaginosa* (n = 3). The yeast that endured the highest concentration, *R. mucilaginosa*, however, resisted only 12 hours in all concentrations. It is more likely that the defense mechanism of the yeast was not able to prevent further damage to its membrane as the time in contact with α -terpineol increased, it could also be that there was an enzymatic degradation to some level, or even that the death of the strain might be due to the production of toxic compounds by that same strain. The TLC results showed that the extracts from CMIB 46 (*R. mucilaginosa*) and CMIB 33 (*L. elongisporus*) could be interpreted as potentially promising results of the production of new compounds by the yeasts. Therefore, both yeasts were cultivated again, thus the analysis could be performed one more time. At last, the results for the consumption of α -terpineol by these two strains were rather inconclusive, mainly due to the low concentration of the samples. For future analysis, it is proposed the use of auxiliary

techniques, such as gas chromatography coupled to mass spectrometer for greater sensitivity in the detection of these compounds.

Keywords: α -terpineol. Aroma-producing Yeasts. Molecular identification. Non-conventional yeasts. Thin Layer Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representando as quatro vias metabólicas principais de síntese de metabólitos secundários.....	12
Figura 2 - Esquema representando os metabólitos secundários resultantes das quatro vias metabólicas principais.....	13
Figura 3 – Estrutura química molecular do α -terpineol	21
Figura 4 – Características macromorfológicas de leveduras dos gêneros <i>R. mucilaginosa</i> , <i>L. elongisporus</i> e <i>C. lusitaniae</i> , a partir do crescimento em Ágar Yeast Malt.....	24
Figura 5 – Representação da árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 réplicas de bootstrap, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com sítios invariantes e deleção parcial. A espécie <i>Naohidea sebacea</i> (CBS 8477) foi usada como um grupo externo.....	26
Figura 6 – Representação da árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 repetições de bootstraps, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com variância gama e deleção parcial. A espécie <i>Schizosaccharomyces pombe</i> foi usada como um grupo externo.	26
Figura 7A - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 10, 22 e 33, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos.....	1
Figura 7B - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 39 e 45, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos	1
Figura 7C - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 46, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos	1
Figura 8 - Placa de CCD mostrando resultados da segunda remessa de amostras, CMIB 33 e 46, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos.....	7
Figura 9 - Exemplos de manchas obtidas em análises de quimiotipos de óleo essencial com uso de vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico como pulverizadores e visualização em luz UV 365nm	9
Figura 10 – Esquema da via de degradação do α -terpineol ao borneol por <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 11 – Esquema das prováveis vias de degradação do α -terpineol por <i>P. incógnita</i>	11
Figura 12 – Esquema da possível via de degradação do α -terpineol por larvas de <i>S. litura</i>	12
Figura 13 – Esquema da biotransformação do α -terpineol pelo fungo <i>Alternaria alternata</i>	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código de depósito das linhagens selecionadas da CMRP e nomenclatura interna da CMIB.....	17
Tabela 1 – Código de depósito das linhagens selecionadas da CMRP e nomenclatura interna da CMIB.....	18
Tabela 2 - Concentração máxima de α -terpineol tolerada pelas leveduras	35
Tabela 3 - Resultados dos controlos positivos da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	41
Tabela 4 - Resultados da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	41
Tabela 4 - Resultados da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5 - Resultados dos controlos positivos da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	6
Tabela 6 - Resultados da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	6
Tabela 6 - Resultados da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.....	7

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitros
°C	Grau Celsius
mL	Mililitros
h	Horas
CP	Controle Positivo
α-T	α-Terpineol

LISTA DE SIGLAS

UTFPR/PG	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa
CMRP	Coleção Microbiológica da Rede Paranaense
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
pH	Potencial Hidrogeniônico
YM	Yeast Malt (Agar)
Rf	Fator de Retenção
RPM	Rotações Por Minuto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ITS	Espaço Interno Transcrito
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

LISTA DE ACRÔNIMOS

CMIB	Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico
CIA	Clorofórmio:Álcool Isoamílico
PEG	Polietilenoglicol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.1.1 Objetivos Específicos	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS COM ÊNFASE EM AROMAS	3
2.1.1 Compostos Aromáticos Obtidos Biotecnologicamente	5
2.1.2 Investigação da Produção Biotecnológica de Aromas da Coleção Microbiológica integrante do CMRP instalada na UTFPR/PG	7
2.2 LEVEDURAS	9
2.2.1 Leveduras Não-Convencionais	10
2.2.2 Rotas Metabólicas em Leveduras Não-Convencionais	11
2.3 TERPENOS	14
2.3.1 Alfa-Terpineol	15
3 METODOLOGIA	17
3.1 LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS	17
3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS	18
3.3 DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS EM MEIO COM PRESENÇA DE ALFA-TERPINEOL	20
3.4 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ALFA-TERPINEOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E ENERGIA PELAS LEVEDURAS	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS SELECIONADAS	24
4.2 POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS INDUSTRIAIS DAS LINHAGENS IDENTIFICADAS	28
4.3 DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS EM MEIO COM PRESENÇA DE ALFA-TERPINEOL	35
4.4 CONSUMO DE ALFA-TERPINEOL PELAS LEVEDURAS	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	16
REFERÊNCIAS	17

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia, de maneira geral, pode ser definida como o estudo de seres vivos microscópicos ou macroscópicos visando a sua manipulação e inserção em diferentes processos, a fim de obter produtos com algum valor agregado (BRASIL, 2019). Os produtos obtidos são, portanto, conhecidos como produtos biotecnológicos.

Desde a antiguidade, processos de caráter biotecnológico são amplamente utilizados principalmente na produção de alimentos e bebidas (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017). Desta forma, muito se tem estudado sobre os micro-organismos responsáveis pela melhora das características organolépticas e tecnológicas de alimentos e bebidas, inclusive relacionadas ao aroma desses produtos, visto que essas propriedades influenciam grandemente na aceitação do produto pelos consumidores (RODARTE, 2008). Nesse contexto, busca-se conhecer o processo de transformação e produção de diferentes biomoléculas por esses micro-organismos a fim de inseri-los em processos industriais.

Leveduras não-convencionais são caracterizadas por conseguirem utilizar diferentes rotas metabólicas, que proporcionam a produção de biomoléculas de interesse e, assim, ressaltam seu potencial biotecnológico. Deste modo, os compostos produzidos por síntese microbiana são tidos como produtos naturais, vindo atender à crescente demanda do mercado por esta categoria de produtos.

Por esta razão, cresceu significativamente, nas últimas décadas, a quantidade de pesquisas que tem como principal objeto de estudo as leveduras não-convencionais. Estas leveduras já são aplicadas em numerosos processos, como na fabricação de alimentos e aditivos alimentares, drogas e na síntese de outros compostos bioquímicos.

A elucidação do consumo de substrato por micro-organismos para a formação de biomoléculas com valor agregado, portanto, é essencial para a aplicação das leveduras em processos industriais. Para tal, no presente estudo, optou-se por testar as leveduras quanto a sua tolerância a um composto monoterpênico, justamente pela vasta aplicação destes compostos em processos industriais.

O composto selecionado foi o α -terpineol, um dos principais componentes encontrados no óleo essencial de diversas plantas. Diante disso, determinou-se o objetivo geral dessa dissertação como abordado a seguir.

1.1 OBJETIVO GERAL

Bioprospectar a capacidade de tolerância e consumo do composto monoterpênico α -terpineol em leveduras não-convencionais depositadas no centro de coleções CMRP da Rede Taxonline.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Identificar por meio de taxonomia molecular as leveduras não-convencionais selecionadas do centro de coleções CMRP da Rede Taxonline, que estão em depósito físico na Coleção CMIB da UTFPR/PG;
- Elucidar potenciais aplicações biotecnológicas industriais destas linhagens com base em sua identificação molecular;
- Analisar a capacidade das 23 leveduras não-convencionais de se desenvolverem na presença α -terpineol;
- Selecionar as leveduras capazes de utilizar o α -terpineol como única fonte de carbono e energia;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente, a obtenção industrial de produtos químicos de alto valor agregado não tem sido dependente apenas da síntese química desses compostos, mas também tem se estendido para a sua produção por meio de processos biocatalíticos.

Em vista disso, muito se tem explorado a produção de sabores e fragrâncias das mais variadas classes estruturais por meio de bioprocessos, incentivando a busca por soluções dentro da pesquisa acadêmica e industrial (SUSHILKUMAR et al., 2008).

Tendo em vista alguns produtos obtidos nestes processos, os próximos tópicos abordarão especialmente a importância dos produtos aromáticos bem como sua origem biológica microbiana.

2.1 PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS COM ÊNFASE EM AROMAS

Diversas indústrias utilizam diferentes sabores e fragrâncias para elaboração de produtos referentes à alimentação humana e animal, cosméticos, fármacos e químicos em geral. Grande parte dos aromatizantes e flavorizantes disponíveis são obtidos por meio de síntese ou extração química (SUSHILKUMAR et al., 2008).

Durante muitas décadas, a pesquisa envolvendo aromas era responsabilidade apenas das indústrias produtoras de aromas. O conceito de aroma abrangia não somente a percepção sensorial, mas também o uso de aromas concentrados, que poderiam ser resultados das sínteses químicas ou da extração destes compostos a partir de plantas (ROTHER, 1988).

Todavia, com a alta demanda do mercado por produtos naturais, aumentou-se as pesquisas na área, evidenciando os aromas produzidos por micro-organismos como uma alternativa à produção convencional de aromas por meio da agricultura (BERGER, 2009).

Os aromas oriundos dos metabólitos microbianos, também conhecidos como bioaromas, são produzidos por meio da fermentação de nutrientes, como açúcares e aminoácidos, pelos micro-organismos, dando origem a compostos voláteis com características aromáticas específicas (LONGO; SANROMÁN, 2006).

Há séculos, os processos fermentativos naturais são reconhecidos por sua influência em características aromáticas típicas de diferentes alimentos e bebidas.

Entre os micro-organismos de interesse alimentício, que podem ser denominados como “micro-organismos produtores de aroma”, primeiramente relatados em um artigo em 1923, se encontram os que produzem aromas semelhantes aos de frutas como abacaxi, maçã, pêra e os que conferem o aroma característico a produtos como leite, vinho, manteiga e queijo. Bolores e leveduras são a classe de micro-organismos com maior capacidade de produção de aromas (OMELIANSKI, 1923). Recentemente, muito se tem estudado sobre estes micro-organismos produtores de bioaromas.

Estima-se que micro-organismos capazes de conferir novas propriedades sensoriais ou de melhorar estas características de alimentos e bebidas vêm sendo utilizados por mais de 8000 anos, ainda que sem o conhecimento dos processos microbianos envolvidos (KNORR; SINSKEY, 1985). Diferentes tipos de fermentação e micro-organismos para produtos fermentados são possíveis, de acordo com as características desejadas para o produto final e a matéria-prima.

Os tipos de fermentação são: a fermentação alcoólica, que tem como principal produto o álcool e pode ser feita por diversos micro-organismos; a fermentação acética, realizada pelas bactérias acéticas, originando principalmente o ácido acético; a fermentação cítrica, que produz o ácido cítrico; a fermentação láctica, responsável pela formação do ácido láctico por diferentes bactérias lácticas; e, por fim, a fermentação butírica, ocorrente após a fermentação láctica e que pode gerar especialmente odores desagradáveis, ocasionados pela formação de compostos como o ácido butírico acético, fórmico, CO₂, álcoois, entre outros (ALMEIDA et al., 2011; MARTINS; VEIGA-SANTOS; CASTILHO, 2014).

Assim como os compostos citados anteriormente, os compostos de aroma mais comuns podem pertencer a distintos grupos de classificações químicas como: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres ou lactonas. Normalmente, os compostos aromáticos mais usuais são reconhecidos por sua alta volatilidade, característica decorrente do seu baixo peso molecular (BICAS et al., 2010).

A produção industrial destes aromas não se dá somente pela fermentação, mas também pode ser realizada por meio de outros processos, como, por exemplo, a biotransformação. A biotransformação consiste na transformação de uma molécula substrato por reações catalisadas com enzimas específicas (isoladas ou em micro-organismos ou ainda em células de plantas), em outra molécula com a estrutura parecida com a original, ou seja, mantendo sua cadeia carbônica (BOMMARIUS;

RIEBEL-BOMMARIUS 2007; FERRARA; SIANI; BON, 2017). O grupo de compostos aromáticos mais abundante da natureza e amplamente utilizado em estudos dos processos de biotransformação é a classe dos terpenos (JANSSENS et al., 1992).

Grande relevância também é atribuída à obtenção biotecnológica de compostos de aroma responsáveis pelos aromas frutais. Normalmente, a produção em laboratório desses aromas sucede ao crescimento conjunto de diversos microorganismos em meios de cultura específicos. Dentre os aromas frutais, os ésteres são a classe mais importante (FILHO, 2018).

2.1.1 Compostos Aromáticos Obtidos Biotecnologicamente

Ésteres são compostos derivados de álcoois e ácidos correspondentes que possuem um número par de átomos de carbono. Os ésteres mais empregados são acetatos e seu componente alcoólico mais habitual é o etanol (WILEY-VCH, 2017).

Os ésteres alifáticos são os principais colaboradores do perfil aromático da maioria das frutas bem como de algumas flores e até mesmo bebidas fermentadas (ILC; WERCK-REICHHART; NAVROT, 2016). Dependendo da sua estrutura, os ésteres podem caracterizar odores específicos ou não, como é o caso dos ésteres de estrutura simples que são os responsáveis pelos aromas frutais típicos. Dessa forma, conforme a cadeia carbônica dos ésteres aumenta, seu aroma frutado vai adquirindo um odor mais similar a odores metálicos, gordurosos ou ainda, semelhantes ao sabão (FILHO, 2018; GUICHARD et al., 2016).

Nos alimentos, os ésteres mais frequentes são os etílicos e acetatos, onde, por exemplo, o acetato de isoamila é um dos compostos dominantes na formação do aroma de banana (WENDAKOON et al., 2006). Geralmente, o éster é bastante empregado em produtos em que se deseja um sabor frutado, assim como também é amplamente utilizado em laticínios (LONGO; SANROMÁN, 2006).

Salvo a obtenção de ésteres por síntese química ou catálise com lipase de ésteres de álcoois e ácidos orgânicos, conforme mencionado anteriormente, a produção microbiana deste composto vem sendo bastante estudada em virtude da produção de ésteres voláteis simples por diferentes rotas bioquímicas microbianas (PARK; SHAFFER; BENNETT, 2009).

Dentre os estudos feitos com a capacidade de produção de algum composto de éster por micro-organismos quando estes foram alimentados de diferentes fontes de carbono, têm-se alguns artigos relatando principalmente leveduras com esta habilidade. Pode-se, portanto citar, o gênero *Geotrichum* sp. (PASTORE et al., 1994), *Neurospora* sp. (YAMAUCHI et al. 1989), a espécie *Kluyveromyces fragilis* (KALLELMHIRI et al., 1993), *Pichia anomala* (TABACHNICK; JOSLYN, 1953), além de diferentes espécies de *Saccharomyces* sp., incluindo *S. cerevisiae* (QUILTER et al., 2003; MØLLER et al., 2002; YOSHIOKA; HASHIMOTO, 1981).

Também utilizados como substratos para a síntese de ésteres, os ácidos desempenham um papel expressivo no aroma característico dos alimentos, normalmente engrandecendo e proporcionando melhorias ao perfil aromático destes produtos. Ainda na questão de aromas frutais, os ácidos alifáticos com C3 ao C8 são grandes representantes, pois são responsáveis por elevar a qualidade das notas frutadas (TACHIHARA et al., 2006; GUICHARD et al., 2016).

Além do aroma frutado, alguns ácidos conferem aroma semelhante ao de queijo. Da mesma forma que com os ésteres, a intensidade e nitidez dos aromas são influenciadas pela estrutura dos ácidos: à medida que a cadeia ácida aumenta, o aroma diminui. Ademais, comumente os ácidos insaturados demonstram aromas mais intensos em relação aos ácidos saturados (GUICHARD et al., 2016; FISHER; SCOTT, 2019).

Tal qual os ácidos, outros compostos de aroma capazes de serem obtidos biotecnologicamente são os álcoois aromáticos que são reconhecidos por atribuir aromas agradáveis a produtos (BERGER, 2009), desde bebidas como cerveja, vinhos e café até queijos e pães (ETSCHMANN et al., 2002). Um importante e frequente álcool aromático produzido por metabolismo microbiano é o 2-feniletanol, composto que é capaz de prover aromas de caráter floral (HUA; XU, 2011).

Por fim, destacam-se também como produtos biotecnológicos de aromas as lactonas. Lactonas reproduzem aromas frutais, adocicado, de coco e até de nozes (JANSSENS et al., 1992). Apesar da possibilidade de obtenção deste composto por síntese química, a produção via fermentação se mostrou bastante vantajosa em diversos estudos utilizando linhagens fúngicas. Um exemplo é a levedura *Sporobolomyces odorus*, capaz de produzir alta quantidade do composto e levar a impressão de odor semelhante ao de pêssego (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989).

Destarte, confirma-se a relevância do uso de bioprocessos para a obtenção de diversos produtos, visto que estes podem apresentar muitas vantagens em relação à síntese artificial. Por exemplo, os bioprocessos normalmente demandam quantidades inferiores de temperatura, pressão e pH, além de serem capazes de utilizar como matéria prima recursos renováveis e produzir quantidades superiores de produto utilizando menor consumo energético (KIRBY; DOWNING; GOHARY, 2010).

Outras vantagens em bioprocessos, ainda, são que os produtos de interesse podem derivar diretamente de glicose, CO₂ ou metano como matérias-primas e, uma vez que as enzimas mais adequadas para a transformação do composto sejam identificadas, é possível transferir a enzima entre diferentes espécies microbiológicas, podendo conectar vias metabólicas com o uso da engenharia genética. Em relação aos produtos formados por esta abordagem, os intermediários que forem reativos ou tóxicos podem ser retidos em compartimentos subcelulares, o que reduz a quantidade de resíduos perigosos. Por fim, o produto final pode ser extraído sem o uso de purificações mais complexas, realizando-se a sua extração por vias de secreção naturais (WALLACE, 2017).

O uso dos bioprocessos também permite que os produtos obtidos biotecnologicamente sejam qualificados como um produto natural, rótulo que tem sido a exigência de muitos consumidores. Da mesma maneira, a biotecnologia voltada para estes processos pode permitir um conjunto maior de possibilidades de compostos que podem ser obtidos somente com o uso desta abordagem (DEMYTTENAERE; VAN BELLEGHEM; KIMPE, 2001).

2.1.2 Investigação da Produção Biotecnológica de Aromas da Coleção Microbiológica integrante do CMRP instalada na UTFPR/PG

A exploração e estudo de novos micro-organismos tornou-se uma atividade frequente, seja para inseri-los em processos, utilizar os produtos do seu metabolismo, como enzimas produzidas especialmente por cada linhagem, ou ainda trabalhar com partes do seu gene com a engenharia genética. Com este intuito, em 2017, foi implantada a Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, integrante do centro de coleções da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) da Rede Taxonline.

A Rede Taxonline (www.taxonline.bio.br) compreende todas as coleções biológicas do estado do Paraná, tendo como subprojeto a CMRP que, por sua vez, representa as coleções microbiológicas do estado. A Universidade Federal do Paraná (UFPR) é a gestora dos programas CMRP e Rede Taxonline e uniu-se com a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) para a consolidação do CMRP como o centro de coleções microbiológicas do Paraná (ALMEIDA, 2018). Com essas três instituições sendo associadas aos projetos, a UTFPR/PG acomoda a instalação física para conservação das linhagens na CMIB.

A Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB), como o nome sugere, abriga, neste momento, 220 micro-organismos que possuem algum potencial biotecnológico. Estas linhagens microbianas são resultantes de diferentes trabalhos de pesquisas de professores pesquisadores da UTFPR/PG (ALMEIDA, 2018). Assim sendo, são originários das mais diversas aplicações gerando uma oportunidade para aprofundar a investigação sobre novos potenciais biotecnológicos pertinentes a cada linhagem.

Dentro da CMIB, existem 54 leveduras não-convencionais, e grande parte delas começaram a ser estudadas de acordo com sua capacidade de fermentação e produção de aromas frutais e florais. Trata-se de fermentos naturais extraídos de alimentos, como uva, iogurte, batata e cana (ALMEIDA, 2018), além de linhagens isoladas de maçã, que já foram utilizadas na produção de sidras e analisadas quanto à sua contribuição ao perfil aromático desta bebida (PIETROWSKI, 2011). No grupo das últimas, estão as linhagens utilizadas no presente trabalho.

Desta forma, os micro-organismos em depósito dentro da coleção ficam disponíveis para estudos acerca de novos potenciais biotecnológicos ou ainda industriais destes organismos. Portanto, no CMRP e, conseqüentemente, na CMIB, cada micro-organismo depositado conta com uma ficha técnica contendo as principais informações sobre uma linhagem. Por meio da ficha técnica, é possível ver os casos em que ainda não tenha sido realizada a caracterização destes micro-organismos, por exemplo, quanto a outras atividades de cunho biotecnológico, incluindo a produção de aromas.

Ao redor do mundo, reforçando os princípios da CMIB quanto ao estudo de micro-organismos de interesse biotecnológico, os micro-organismos que são mais comumente utilizados, justamente por suas especificidades de comportamento

perante diferentes substratos, são as leveduras. Estas tem recebido amplo destaque, pois apresentam elevada capacidade de produção de moléculas de grande valor agregado, e conseqüentemente, geram um alto retorno econômico (JOHNSON, 2013). Isto posto, o tópico a seguir abordará mais sobre as leveduras e o seu viés biotecnológico.

2.2 LEVEDURAS

Considerando a diversidade de características morfológicas e fisiológicas das leveduras, é natural que elas sejam capazes de se desenvolver em uma ampla variedade de habitats. As leveduras são geralmente encontradas na natureza, principalmente em folhas e flores de plantas, solo e água salgada, mas também habitam a pele e o trato intestinal de animais de sangue quente, onde conseguem existir simbioticamente ou na forma de parasitas (MONTES DE OCA et al., 2016).

Dessa forma, sabe-se que grande parte das leveduras utiliza açúcares como principal fonte de carbono e energia, porém, algumas linhagens são capazes de utilizar outras fontes de carbono. Ademais, a maioria das linhagens leveduriformes consegue metabolizar fontes de nitrogênio para a realização da biossíntese de aminoácidos e, conseqüentemente, produção de proteínas (FELDMANN, 2012).

Todas estas características facilitaram a adoção deste organismo como um micro-organismo modelo para estudos metabólicos, celulares e moleculares, sendo a principal representante deste grupo a linhagem *Saccharomyces cerevisiae*. Reconhecida como um dos mais antigos organismos a ser domesticado, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada pela humanidade na elaboração de alimentos e bebidas há milhares de anos. Isto se deve à sua excelente capacidade de fermentação, que a permite ser facilmente inserida numa variedade de processos que envolvam o consumo de açúcar para a formação de compostos como etanol e dióxido de carbono (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Logo, em virtude das suas possíveis capacidades industriais ainda não investigadas e às individualidades desta linhagem em relação às outras espécies de leveduras identificadas, *S. cerevisiae* se tornou um importante objeto de pesquisa mundialmente. Na década de 1930, esta linhagem foi apresentada por Hershel Roman

(ROMAN, 1981) como organismo experimental e muitos pesquisadores passaram a reconhecê-la como um sistema ideal para estudo dos mecanismos celulares.

Por volta de 1950, os pesquisadores constataram a oportunidade de isolamento de compostos úteis e componentes celulares de levedura a fim de esclarecer suas funções. Por fim, a *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU et al. 1996).

Nos anos posteriores, outras espécies de levedura, além da *S. cerevisiae*, começaram a ser percebidas por apresentarem funções interessantes biotecnologicamente e, então, passaram a ser investigadas, ficando conhecidas como leveduras não-convencionais.

2.2.1 Leveduras Não-Convencionais

Recebem o nome de leveduras não-convencionais o grupo de leveduras que não pertence ao grupo das *Saccharomyces* sp. ou *Schizosaccharomyces pombe*, portanto também sendo conhecidas como leveduras não-*Saccharomyces*. Essas linhagens foram assim denominadas por pesquisadores que perceberam a capacidade destas linhagens de serem utilizadas em processos não convencionais (SREEKRISHNA; KROPP, 1996; KRĘGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2017), com condições mais extremas ou com consumo de diferentes substratos.

Em comparação com *S. cerevisiae*, as leveduras não-convencionais apresentam potenciais benefícios, principalmente referindo-se às exigências das rotas metabólicas, às características do produto formado e à fisiologia do crescimento das linhagens (REBELLO et al., 2018).

As leveduras não-convencionais, deste modo, possibilitam o consumo de diferentes substratos ocasionando a formação de novos produtos, de forma que esta conversão ocorra por meio de rotas metabólicas alternativas às rotas convencionalmente usadas por leveduras como *S. cerevisiae*, que serão vistas no tópico seguinte.

Cerca de 1500 espécies de leveduras foram previamente identificadas e reconhecidas (BOEKHOUT, 2005), portanto, é natural que se encontrem leveduras com habilidades diferenciadas no meio desta variedade de linhagens estudadas. Logo, tem-se estudos que demonstram que algumas linhagens de leveduras não-

convencionais são reconhecidas por apresentarem alta tolerância a algumas condições que podem surgir durante processos biotecnológicos. Por exemplo, a tolerância ao sal e estresse oxidativo da *Yarrowia lipolytica*, tolerância ao calor da *Ogataea polymorpha*, a termotolerância extrema das linhagens *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, e a adaptabilidade em condições extremas da *Kluyveromyces lactis* (WOLF, 2012).

Em relação aos substratos consumidos, pode-se ressaltar o consumo de hidrocarbonetos, ácidos graxos, outros lipídios e compostos relacionados pelas linhagens de *Y. lipolytica* e *Candida maltosa*. Outras espécies que também se destacam nesse quesito são a *Schwanniomyces occidentalis*, que consegue metabolizar completamente o polissacarídeo amido, a *Kluyveromyces lactis* capaz de consumir a lactose como única fonte de carbono e energia, a *Arxula adenivorans* que realiza a assimilação de adenina bem como de outras purinas e, por fim, as espécies do gênero *Pichia* (*P. pastoris*, *P. methanolica* e *P. angusta*), metabolizantes de metanol. Tais espécies de *Pichia* ainda são amplamente utilizadas na produção de proteínas heterólogas (SPENCER; RAGOUT DE SPENCER; LALUCE, 2002).

Não obstante, entre as leveduras não-convencionais, existem estudos sobre a aplicação de *Trichosporon* spp. como sensor microbiano, reafirmando os variados destinos dados a este grupo de micro-organismos (REISER et al. 1994).

Todas essas características especiais das leveduras não-convencionais, principalmente em relação à produção de metabólitos de alto valor, são possibilitadas graças à utilização de diferentes rotas metabólicas por estas linhagens.

2.2.2 Rotas Metabólicas em Leveduras Não-Convencionais

De maneira geral, os metabólitos microbianos são os produtos químicos produzidos pelos micro-organismos vivos, originados a partir de seu metabolismo e classificados em metabólitos primários ou secundários. Os metabólitos primários, de maneira geral, compreendem o grupo de produtos comuns a todas as espécies de organismos, divididos nos grupos de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (SCHAAF; WALTER; HESS, 1995; SANTOS, 2001).

Em contrapartida, os metabólitos secundários são compostos não-comuns a todas as espécies, podendo funcionar como parâmetro de caracterização de uma

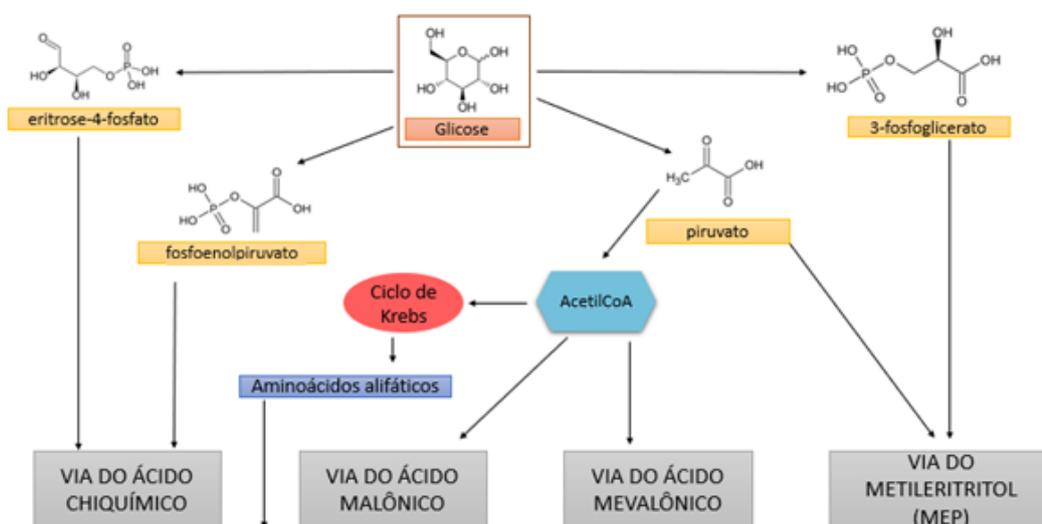
espécie ou gênero (taxonomia química) (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008). Esses metabólitos não participam de processos de geração de energia e possuem uma grande variedade em sua estrutura normalmente sendo produzidos em virtude de estímulos especiais (CAMPBELL, 1985). Conseqüentemente, muitas vezes sua função não é totalmente compreendida.

Os metabólitos secundários são divididos em grupos onde pode-se citar principalmente os terpenoides, alcaloides, xiquimatos, policetídeos, entre outros (DEY; HARBONE, 1997; SELL, 2003; DEWICK, 2009).

Até o momento, tem-se conhecimento de aproximadamente 300.000 metabólitos secundários que já foram descritos e identificados, e pressupõe-se que sua principal função seja auxiliar na adaptação e sobrevivência de um organismo, em virtude da sua capacidade de atrair ou repelir outros organismos capazes de influenciar nesse fator (McMURRY, 2014).

Essa variada amplitude de substâncias pode ser sintetizada por meio de quatro vias metabólicas principais: via do ácido chiquímico, via do ácido malônico, via do ácido mevalônico e via do metileritritol fosfato, cujos precursores são originários do metabolismo primário, como demonstra a figura 1 a seguir.

Figura 1 - Esquema representando as quatro vias metabólicas principais de síntese de metabólitos secundários



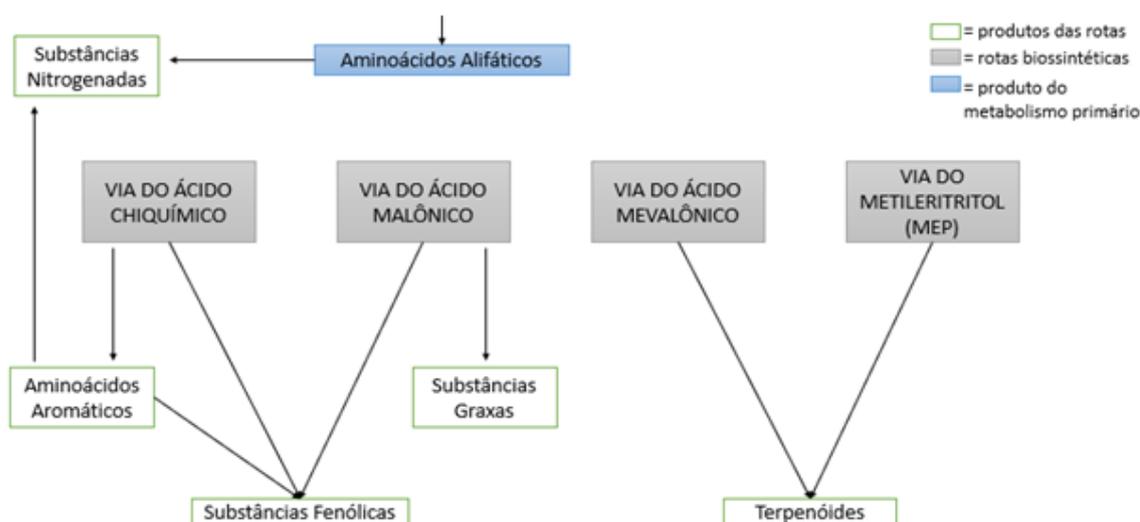
Fonte: Adaptado de Taiz; Zeiger (2009)

Conforme apresentado no esquema, pode-se perceber que os precursores de todas essas vias metabólicas têm origem no metabolismo primário de organismos.

Deste modo, os precursores fundamentais para os metabólitos secundários são o ácido chiquímico, o ácido mevalônico, a acetilcoenzima A e o metileritritol fosfato (DEWICK, 2009).

Tem-se, então, que a via do ácido chiquímico se forma pela reação da eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato, sendo o ácido chiquímico uma das rotas de grande relevância devido a ser responsável pela síntese da maioria dos constituintes possuidores de núcleos benzênicos (GEISSMAN; CROUT, 1969). Além disso, ressalta-se também o ácido mevalônico, resultante de três moléculas de ácido acético condensadas, que tem seu início com a redução da β -hidróxi- β -metilglutaril coenzima A. Portanto, cada uma dessas rotas é responsável pela síntese de produtos de importante valor agregado, como demonstrado no esquema abaixo.

Figura 2 - Esquema representando os metabólitos secundários resultantes das quatro vias metabólicas principais



Fonte: Adaptado de Taiz; Zeiger (2009)

Conforme observado, além da via do metileritritol fosfato, a via do mevalonato é uma das formas de obtenção dos terpenoides. Sendo iniciada a partir da Coenzima A, tem-se a produção do ácido mevalônico seguida de sua conversão em isopreno.

2.3 TERPENOS

Terpenoides podem ser definidos como “materiais com estruturas moleculares contendo estruturas de carbono constituídas por isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno)” (SELL, 2003). As unidades de isopreno são formadas por cinco carbonos ($\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$) (ALDRED; BUCK; VALL, 2009).

Os terpenos são, em sua maior parte, classificados como hidrocarbonetos, representados de maneira geral pela fórmula $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$, onde o n significa o número de unidades de isopreno presentes na estrutura. O número correspondente de unidades de isopreno determina a subdivisão dos terpenos nas seguintes classes: hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides, poli-isoprenoides, esteroides e carotenoides. Esteroides e carotenoides são pertencentes aos triterpenóides e tetraterpenóides respectivamente. (ALDRED; BUCK; VALL, 2009; SELL, 2003).

Compostos terpênicos têm uma farta aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Podem ser aplicados como agente analgésico (OLIVEIRA et al., 2014), agente inseticida (JUNIOR, 2003), produtos para cicatrização de acne (BOMBARDELLI; CAIROLI, 2009), composição de perfumes (PYBUS; SELL, 2007), aromas de bebidas fermentadas (HOLT et al., 2018), aromas de frutas em alimentos (CAPUTI; APREA, 2011), agente antioxidante e agente antimicrobiano (TOSCAN, 2010), na composição de medicamentos (PADUCH et al. 2007), entre outras aplicações.

Dada a ampla possibilidade de aplicação desse composto, diversas indústrias, como a indústria alimentícia, por exemplo, têm grande interesse na biotransformação do terpeno, visto que este possui uma grande aplicabilidade como aroma em alimentos e bebidas. Os terpenos mais aromáticos são o linalol, o nerol, o geraniol e o citronelol. Entre a classe de micro-organismos que mais produz terpenos estão os fungos, principalmente pertencentes as espécies dos ascomicetos e basidiomicetos (LONGO; SANROMÁN, 2006).

A classe de terpenos mais representativa é a classe dos monoterpenos, que compõem 90% dos óleos essenciais, englobando diversas estruturas diferentes. Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno, contendo 10 carbonos e podem ser lineares (acíclicos) ou conter anéis. Embora sua origem principal seja a partir do metabolismo secundário de plantas, alguns representantes desta classe se

originam do metabolismo animal e microbiano (TCHIMENE et al., 2013). Um importante tipo de monoterpene são os terpineóis, brevemente abordados a seguir.

2.3.1 Alfa-Terpineol

Presentes abundantemente em organismos vegetais, os terpineóis consistem em alcoóis terciários monoterpênicos monocíclicos divididos em cinco isômeros mais frequentes: alfa, beta, gama, delta e terpinen-4-ol. Com odor considerado agradável, aproximado ao aroma da *Syringa vulgaris* (lilás), o α -terpineol é um dos terpineóis mais habituais encontrados na natureza, recebendo grande destaque na área industrial. Outro isômero tão amplamente encontrado é o terpinen-4-ol (KHALEEL, TABANCA; BUCHBAUER, 2018).

O α -terpineol é um álcool monoterpênico monocíclico que está amplamente distribuído na natureza. Suas principais fontes são as flores (narciso e frésia), as ervas e especiarias (salvia, manjerona, orégano e alecrim), o óleo da folha de *Melaleuca alternifolia* e o óleo originado da casca de limões. O α -terpineol muitas vezes é associado, por causa de seu odor, com “desinfetante de pinheiro”, em razão desta substância compor, efetivamente, o desinfetante de pinheiro (SELL, 2003).

Industrialmente, assim como os compostos terpênicos de maneira geral, o α -terpineol tem sido testado em variadas aplicações, como na produção de perfumes e cosméticos (KHALEEL, TABANCA. BUCHBAUER, 2018), na indústria de alimentos, e até na preparação de copolímeros (YADAV; RIVASTAVA, 2007). Suas propriedades na área da medicina vem sendo estudadas quanto ao seu efeito analgésico (SOLEIMANI, 2019), capacidade anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2012), provável atividade anticâncer (HASSAN et al., 2010), além de também ter sido estudado como composto gastroprotetor (SOUZA et al., 2011), anti-hipertensivo e antioxidante (SABINO et al., 2013).

Em virtude desta ampla gama de aplicações, o α -terpineol pode ser obtido por via sintética, por extração natural ou por via biotecnológica. Algumas das formas de obtenção de α -terpineol são: por meio da hidratação do α -pineno em presença de catalisador ácido (UTAMI et al., 2010), a partir do (+)-limoneno (BAPTISTELLA et al., 2009), por produção em uma “fábrica” projetada de células de *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG et al., 2019), entre outras.

Em suma, visto se tratar de um composto de grande relevância e presença na natureza, surgiu-se o interesse de avaliação do possível consumo deste composto por micro-organismos, além da análise de formação de novos compostos que poderiam apresentar certo valor agregado.

3 METODOLOGIA

A metodologia foi desenvolvida em sua totalidade dentro dos laboratórios de Bioengenharia, Bioquímica, Microbiologia e da Coleção CMIB da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, com os recursos já existentes na instituição.

3.1 LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS

Foram selecionadas 23 leveduras não-convencionais das leveduras produtoras de bioaromas frutais isoladas por Pietrowski (2011), atualmente armazenadas na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB), integrante da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) da Rede Taxonline (www.taxonline.bio.br). As nomenclaturas oficiais de depósito destas linhagens estão descritas na tabela a seguir. Essas leveduras foram isoladas a partir do mosto de maçãs saudáveis dos cultivares Gala e Fuji (PIETROWSKI, 2011), e conservadas na CMIB desde 2017, no Campus Ponta Grossa da UTFPR.

Tabela 1 – Código de depósito das linhagens selecionadas da CMRP e nomenclatura interna da CMIB

(continua)

Número linhagem	Nomenclatura oficial CMRP	Outras nomenclaturas
1	CMRP3160	CMIB 001
2	CMRP3163	CMIB 004
3	CMRP3165	CMIB 006
4	CMRP3167	CMIB 008
5	CMRP3169	CMIB 010
6	CMRP3170	CMIB 011
7	CMRP3171	CMIB 012
8	CMRP3172	CMIB 013
9	CMRP3175	CMIB 016
10	CMRP3177	CMIB 018
11	CMRP3180	CMIB 021
12	CMRP3181	CMIB 022
13	CMRP3184	CMIB 025
14	CMRP3189	CMIB 030
15	CMRP3192	CMIB 033

Tabela 1 – Código de depósito das linhagens selecionadas da CMRP e nomenclatura interna da CMIB

(conclusão)

Número linhagem	Nomenclatura oficial CMRP	Outras nomenclaturas
16	CMRP3195	CMIB 036
17	CMRP3197	CMIB 038
18	CMRP3198	CMIB 039
19	CMRP3199	CMIB 040
20	CMRP3202	CMIB 043
21	CMRP3203	CMIB 044
22	CMRP3204	CMIB 045
23	CMRP3205	CMIB 46

Fonte: Autoria Própria (2020)

Para armazenamento na coleção, as linhagens são mantidas congeladas a -20 °C em tubos com glicerol, passando por um repique em meio de cultura Ágar Sabouraud a cada 6 meses. Da mesma maneira, para uso no presente trabalho, os micro-organismos selecionados foram reativados em Ágar Sabouraud e incubados a 30 °C por 3 a 7 dias, até crescimento das colônias.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS

Para sua identificação, as leveduras foram repicadas em estriamento contínuo em Ágar Sabouraud com adição de 100 µL do antibiótico gentamicina para cada 30 mL de ágar adicionado às placas, de forma a inibir crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias. Após o período de incubação, com o crescimento das colônias, cerca de 1 cm² do micélio da colônia foi transferido para microtubos do tipo eppendorf de volume 1,5 mL contendo 300 µL do detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio 2% (CTAB) e uma mistura de sílica e celite (proporção 2:1) (VICENTE et al., 2008).

Para a extração de DNA das leveduras, foi seguido o protocolo estabelecido por Vicente et al. (2008), utilizando o detergente CTAB e o reagente clorofórmio: álcool isoamílico. O material biológico que havia sido colocado no tubo do tipo eppendorf com CTAB e sílica-celite foi triturado por aproximadamente 5 minutos com auxílio de pistilos de plástico esterilizados. Então, foi adicionado mais 200 µL de CTAB aos tubos que foram posteriormente incubados a 65 °C por 10 minutos.

Após a incubação, adicionou-se 500 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), e o conteúdo do tubo foi homogeneizado por inversão. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 7 minutos onde foram obtidas duas fases: aquosa e orgânica. A fase aquosa foi transferida para tubos esterilizados, acrescentando-se 800 µL de etanol 96% para a precipitação do DNA em freezer a -20 °C pelo período de 12 horas. A fase orgânica foi descartada.

Depois da precipitação do DNA, a amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. Por fim, o pellet de DNA foi lavado com 1000 µL de álcool 70% gelado e, então, ressuspendido em água ultrapura. A qualidade e integridade do DNA isolado foi verificada em gel de agarose a 0,8%, com condições de corrida de 70 volts por 30 minutos e corado com brometo de etídio para posterior visualização em Transiluminador.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador AXYGEN® Maxygene II modelo THERM-1000 com condições e reagentes conforme estabelecidos em protocolos padrões adotados no laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa e descritos adiante.

A região amplificada foi a região interespaçadora do gene que codifica o DNA ribossomal (ITS), onde os primers utilizados para a amplificação foram o ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). As concentrações dos reagentes para o mix e as condições de amplificação foram adaptadas de Nascimento (2013) e são relatadas a seguir. Para o mix da reação, foram utilizados por amostra: 2 µL de DNA molde, 14 µL de H₂O ultrapura, 2,5 µL de dNTP's, 2,5 µL de tampão Buffer 10X, 1,3 µL de MgCl₂, 1,3 µL de cada primer e, por fim, 0,3 µL de Taq DNA Polimerase Platinum.

As condições de amplificação utilizadas no termociclador foram: 95 °C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94 °C por 45 segundos para a desnaturação, 52 °C por 45 segundos para o anelamento, 72 °C por 2 minutos para a extensão e 72 °C por 7 minutos para a extensão final. A reação foi completada em 35 ciclos.

Os produtos de PCR foram então purificados com o polímero Polietilenoglicol 8000 (PEG), conforme o seguinte protocolo de Mikheyev (2009): adicionou-se o reagente PEG ao microtubo da PCR em quantidade proporcional ao volume do produto da PCR (25 µL), misturando a solução algumas vezes com a micropipeta e transferindo-a para novo tubo. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 30

minutos, centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta.

Então, foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado, submetendo o tubo a centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante novamente foi descartado e foram acrescentados 125 µL de etanol 96% gelado pelas paredes do tubo, retirando-o logo em seguida. Após evaporar o restante do etanol 96% com a ajuda do banho-seco, o DNA purificado foi ressuspenso em 15 µL de água ultrapura, deixando-o a 37 °C por 30 minutos em banho-seco.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com) e as sequências foram tratadas no software BioEdit e comparadas no banco de dados internacional de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

A partir dos dados obtidos pelo sequenciamento, construíram-se árvores filogenéticas relacionando as espécies encontradas e confirmando os resultados das amostras que obtiveram menos do que 100% de semelhança com a sequência em depósito no banco de dados. Para as árvores, utilizaram-se como grupo externo de comparação as espécies *Schizosaccharomyces pombe* e *Naohidea sebacea* (CBS 8477).

3.3 DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS EM MEIO COM PRESENÇA DE ALFA-TERPINEOL

As melhores condições para o crescimento das leveduras estudadas foram determinadas experimentalmente previamente ao início dos testes com monoterpeno. Essas condições englobaram principalmente o pH ótimo de crescimento e a tolerância ao álcool desempenhada por essas leveduras. Os valores de pH testados foram pH 5,0, pH 7,5 e pH 8,0, cujo crescimento celular foi verificado por meio da contagem de células leveduriformes por Câmara de Neubauer. Para a avaliação da tolerância ao álcool, o desenvolvimento microbiano foi analisado por espectrofotômetro UV-Vis.

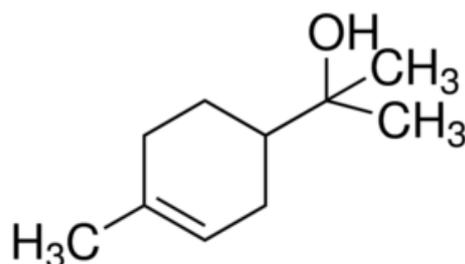
A metodologia para verificar o desenvolvimento em contato com o α -terpineol, então, foi adaptada de Oliveira-Felipe (2015), conforme descrito a seguir. As colônias de leveduras crescidas anteriormente em Ágar Sabouraud foram repicadas em tubos com caldo Yeast Malt (YM) o qual teve seu pH corrigido para 5,0 e foi composto de

(m/v): 0,5 % de peptona, 1,0 % de glicose, 0,3 % de extrato de malte e 0,3 % de extrato de levedura. Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 h.

Após a incubação, as culturas foram diluídas equivalentemente ao nível 0,5 da escala de McFarland e foram verificadas por contagem em Câmara de Neubauer, ainda em caldo YM pH 5,0. O espectrofotômetro não foi utilizado em virtude da quantidade de amostras trabalhadas. Em seguida, foi adicionado a microtubos do tipo eppendorf 1 mL de cada cultura diluída com headspace de 0,5 mL, onde, em triplicata, acrescentaram-se quantidades da mistura α -terpineol e álcool correspondentes a 2,5 μ L/mL, 5,0 μ L/mL, 7,5 μ L/mL e a 10,0 μ L/mL de concentração.

O monoterpreno utilizado foi o α -terpineol ($C_{10}H_{18}O$) da Sigma Aldrich®, com sua estrutura molecular representada adiante, de grau técnico, CAS number 98-55-5 e 90% de pureza. Antes de ser acrescentado ao meio, o α -terpineol foi misturado com quantidade igual de álcool, que foi filtrado em filtro milipore 0,22 μ M, para melhor diluição do composto terpênico no meio de cultura líquido.

Figura 3 – Estrutura química molecular do α -terpineol



Além das triplicatas de diferentes concentrações, mantiveram-se controles positivos com glicose e controles positivos com álcool, para confirmar que o fator limitante do crescimento não fosse o álcool. Manteve-se também um controle negativo com o meio esterilizado. Os tubos foram incubados em termo bloco VHD® com agitação (modelo B1-AQ/AG-100) a 30 °C sob agitação de 700 rpm por 48 h (condições também previamente otimizadas).

Depois das 48 h, as culturas em eppendorf foram homogeneizadas e 100 μ L foram transferidos para placas de Petri com meio sólido YM (1,7 % de ágar bacteriológico). As placas foram incubadas em estufa 30 °C, por tempo suficiente para o crescimento de colônias (em média 3 dias).

Todavia, durante a incubação com o α -terpineol, amostras que apresentaram acúmulo visível de massa biológica ao fundo do tubo de eppendorf, mas não

apresentaram crescimento em placas de Petri quando plaqueadas após 48 h, foram cultivadas novamente e plaqueadas assim que completaram 24 h de incubação em meio líquido.

Ainda, para amostras que apresentaram um grande acúmulo de massa biológica durante as primeiras horas de cultivo nos tubos de eppendorf, foram realizados plaqueamentos após 6 h, 12 h, 18 h e 24 h de contato com o α -terpineol.

3.4 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ALFA-TERPINEOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E ENERGIA PELAS LEVEDURAS

Para avaliação do consumo do α -terpineol, ainda seguindo o protocolo de Oliveira-Felipe (2015), as leveduras foram inoculadas em meio mineral DP líquido (1 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 0,5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 20 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O) com a adição de 2,5 μ L/mL de α -terpineol, concentração na qual as linhagens se mostraram tolerantes. O cultivo foi feito em microtubos de eppendorf de 1,5 mL com headspace de 0,5 mL. Posteriormente as leveduras foram incubadas em termo bloco VHD ® com agitação (modelo B1-AQ/AG-100) a 30 °C sob agitação de 700 rpm por 48 h, onde realizaram-se coletas de 12h em 12h. Também foram utilizados controles positivos, ou seja, o cultivo da levedura sem o α -terpineol, e controle negativo, preparado somente com o meio de cultura esterilizado. As coletas foram congeladas até a extração.

A extração foi feita para todas as amostras, inclusive os controles, da seguinte forma: os microtubos de eppendorf com 1 mL de amostra coletada cada foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, transferiu-se 500 μ L do sobrenadante para um novo microtubo, onde acrescentou-se mais 500 μ L de etanol absoluto. Os tubos, então, foram novamente centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos. Por fim, adicionou-se 200 μ L de diclorometano, reagente utilizado por Llorens-Molina et al. (2017), e as amostras foram para mais uma centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, houve a separação de fases, em que a fase aquosa/etanólica foi descartada e a fase do diclorometano foi coletada para um vial âmbar e congelada até a análise por cromatografia em camada delgada.

A cromatografia em camada delgada foi utilizada com o intuito de observar se houve consumo do α -terpineol e a formação de possíveis novos produtos baseando-se nos pontos observados visualmente após a análise cromatográfica.

Para a realização da cromatografia em camada delgada então, utilizaram-se placas de sílica gel com fluorescência em UV MACHEREY-NAGEL ® (Alemanha). Portanto, primeiramente, marcou-se as placas com a identificação das amostras e a placa foi levada a estufa 100°C por 1h, a fim de fazer a ativação desta.

Enquanto a placa estava na estufa, preparou-se a fase móvel tolueno:acetato de etila (93:7) e adicionou-se a fase na cuba para saturação (WAGNER; BLADT, 2009). Depois do tempo de ativação, a placa foi retirada e 10 µL de cada amostra foram aplicados em cada ponto marcado. Na sequência, as placas foram inseridas na cuba e a fase móvel correu por 17 cm a partir do ponto de aplicação da amostra. Por fim, a placa foi retirada da estufa para secar e foi lida em câmara escura com luz UV. Os dados foram registrados.

Após a visualização em UV, preparou-se o revelador p-anisaldeído ácido sulfúrico com 0,5 mL de p-anisaldeído, 50 mL de ácido acético e 1 mL de ácido sulfúrico (MERCK CHEMICAL WORKS, 1971). O revelador, então, foi pulverizado sobre a placa com um pulverizador Top Spray capacidade 250ml (Marco Boni), e, em seguida, a placa foi inserida na estufa a 105°C até visualização máxima dos pontos. As cores e intensidade das manchas foram observadas e a distância percorrida por cada mancha foi medida a fim de calcular o Rf de cada amostra.

O processo de cultivo e análise cromatográfica foi repetido para duas das linhagens, CMIB 33 e CMIB 46. As mesmas condições anteriores foram utilizadas, exceto a distância percorrida pelo solvente, que na segunda corrida foi 1 cm menor do que a análise em CDD anterior, portanto, totalizando 16 cm, devido a interferências laboratoriais no dia da análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

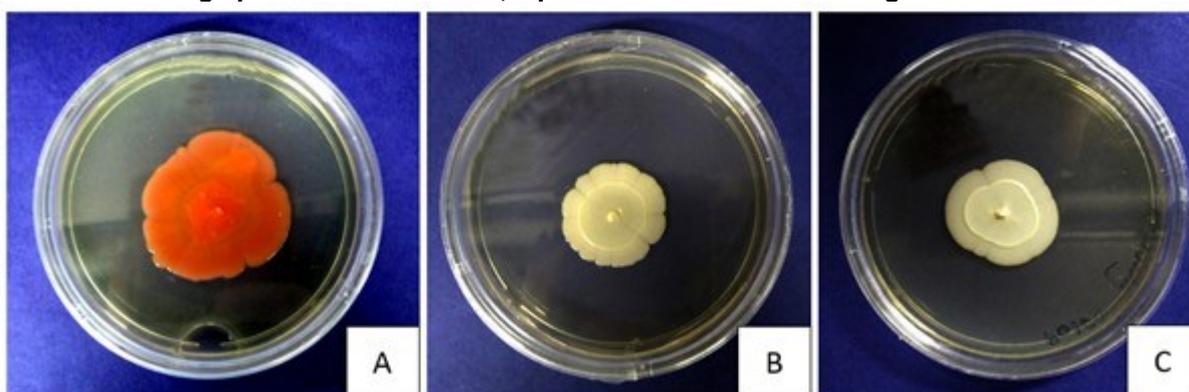
Sendo isoladas a partir de maçãs, as leveduras não-convencionais utilizadas no presente estudo foram selecionadas precisamente pela sua capacidade de produção de aromas. O aprofundamento nas implicações deste perfil de leveduras foi o fator que possibilitou a escolha de um monoterpene para investigar um novo potencial biotecnológico para estas linhagens.

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS SELECIONADAS

De forma a contribuir com sua manutenção na coleção CMIB, visto que a coleção havia sido recém-instalada ao início deste trabalho, foi realizada a identificação molecular de todas as 23 leveduras não-convencionais selecionadas antes de se prosseguir com a verificação das tolerantes ao composto monoterpênico. Constatou-se que, no total, 12 leveduras foram identificadas como *Clavispora lusitaniae*, 8 como *Rhodotorula mucilaginosa* e 3 como *Lodderomyces elongisporus*.

Atualmente, com o sequenciamento de genomas, manutenção de bancos de dados e novas classificações taxonômicas, muitas vezes é necessário combinar a identificação molecular com os aspectos morfológicos das colônias microbianas. Os três tipos de colônias apresentados pelas leveduras selecionadas para o presente trabalho estão demonstrados na figura 3, a seguir.

Figura 4 – Características macromorfológicas de leveduras dos gêneros *R. mucilaginosa*, *L. elongisporus* e *C. lusitaniae*, a partir do crescimento em Ágar Yeast Malt



A: *R. mucilaginosa*; B: *L. elongisporus*; C: *C. lusitaniae*. Fonte: Autoria própria (2020)

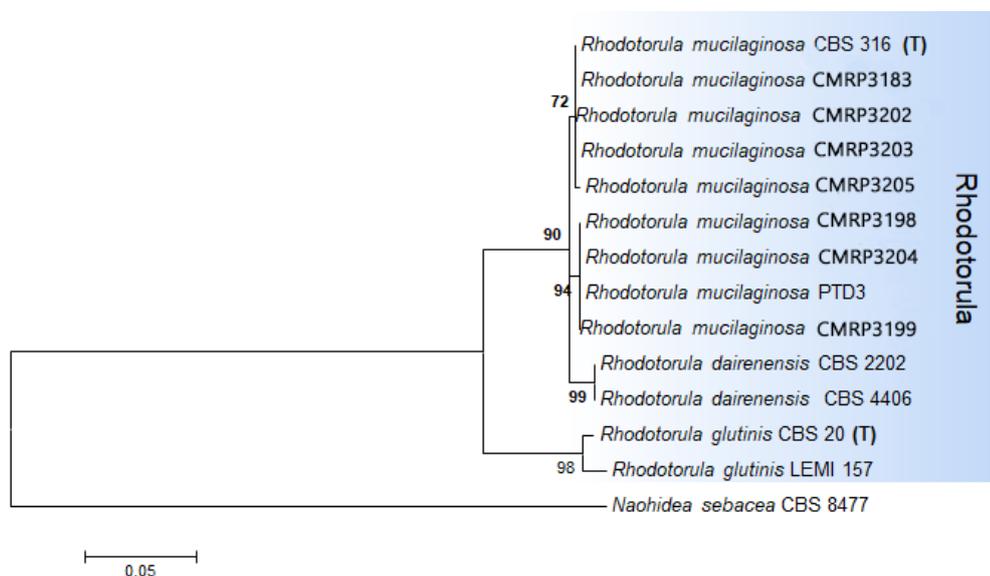
O aspecto das colônias apresentado por cada uma das linhagens corresponde com o esperado por cada espécie segundo a literatura. Observou-se que as colônias das oito linhagens de *R. mucilaginosa* identificadas apresentaram coloração alaranjada e crescimento em velocidade média quando cultivadas em ágar YM (Figura 3, A). A maior parte das espécies de *Rhodotorula* formam colônias de coloração rosa a coral, podendo também variar de laranja para vermelho caso sejam cultivadas em ágar Sabouraud com a presença de pigmentos carotenoides. O aspecto da colônia é descrito como macia, lisa, úmida e algumas vezes mucoide (LARONE, 2002).

Por sua vez, as colônias de *Lodderomyces elongisporus* (Figura 3, B), também cultivadas em ágar YM, se mostraram em cor branca com crescimento lento. As colônias de *L. elongisporus* tem completa semelhança com as colônias de *C. parapsilosis*, portanto sendo descritas como brancas, cremosas, brilhantes e lisas ou enrugadas, principalmente quando cultivadas em meio Sabouraud (LAFHEY, 2005).

Por fim, colônias de *Clavispora lusitaniae* em meio YM são de cor branca, brilhantes ou eventualmente amorfas e rugosas (LACHANCE, 2011), tal qual as colônias repicadas neste trabalho, reforçando a identificação molecular.

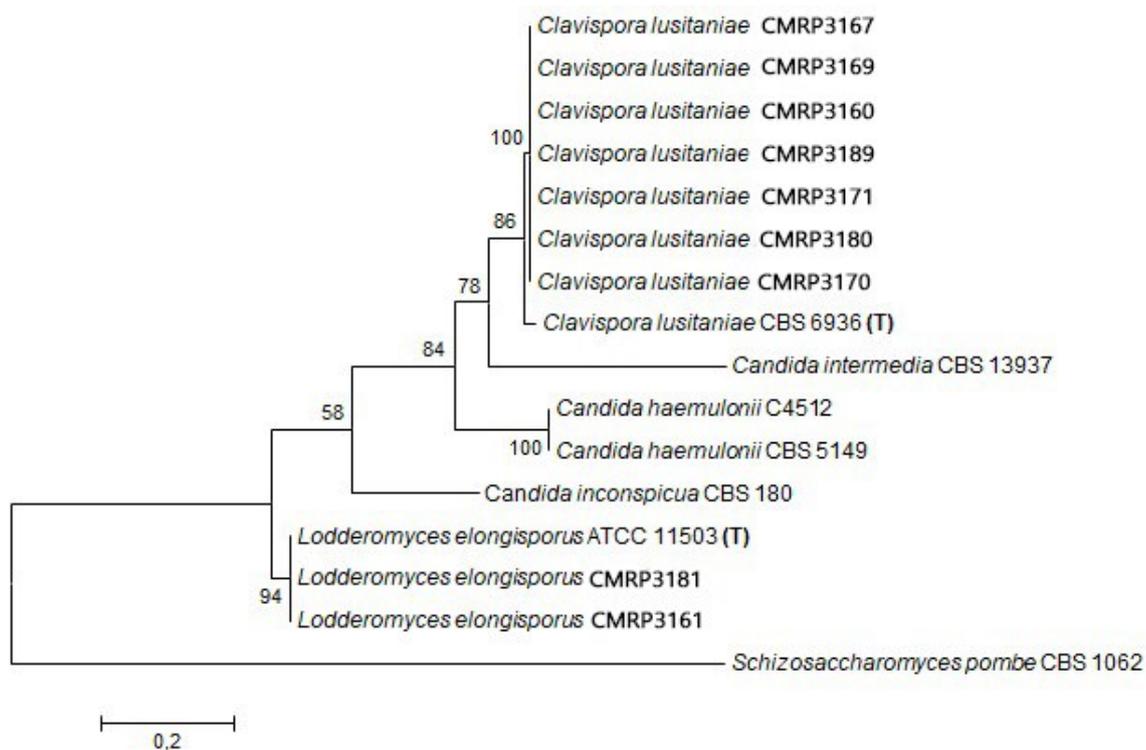
De forma a também contribuir com a identificação molecular e verificar a relação filogenética entre as linhagens estudadas, construíram-se árvores filogenéticas principalmente para as linhagens que apresentaram 99% de precisão na comparação com as sequências em depósito no banco de dados do NCBI. As duas árvores são representadas a seguir (Figura 4 e 5) e demonstram que dentre as 3 principais espécies encontradas, duas delas (*Clavispora lusitaniae* e *Lodderomyces elongisporus*) apresentam maior proximidade genética entre si em relação a *Rhodotorula mucilaginosa*.

Figura 5 – Representação da árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 réplicas de bootstrap, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com sítios invariantes e deleção parcial. A espécie *Naohidea sebacea* (CBS 8477) foi usada como um grupo externo.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 6 – Representação da árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 repetições de bootstraps, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com variância gama e deleção parcial. A espécie *Schizosaccharomyces pombe* foi usada como um grupo externo.



Fonte: Autoria própria (2020)

Para o sequenciamento de *Clavispora lusitaniae*, espécie encontrada em mais da metade das amostras sequenciadas, normalmente recomenda-se a amplificação da região ITS (MYCOLOGY, 2016), assim como foi executado na atual pesquisa.

A espécie *Clavispora lusitaniae* se trata uma levedura não-convencional, haplóide, oportunista, pertencente ao grupo dos ascomicetos (HOLZSCHU et al., 1979). Essa espécie foi estabelecida por Rodrigues de Miranda (1979), se tratando de um teleomorfo da levedura *Candida lusitaniae*. Todavia, a *Clavispora lusitaniae* possui ascósporos clavados, característica normalmente desconhecida em espécies de leveduras, portanto tendo recebido a classificação sob o gênero *Clavispora* sp.

Patógeno oportunista em humanos, o micro-organismo *Clavispora lusitaniae* é responsável por colonizar e infectar humanos, podendo causar candidíase disseminada, incluindo septicemia e pielonefrite (KIDD et al., 2016).

No entanto, as linhagens de *Clavispora lusitaniae* são amplamente encontradas no meio ambiente, podendo ser isoladas de águas, solos e plantas, além de ser isoladas a partir de outros substratos tal qual o trato gastrointestinal de diversos animais, como pássaros e mamíferos, inclusive seres humanos (DURRENS, 2017).

O sequenciamento de seu genoma a partir da linhagem *C. lusitaniae* CBS 6936, isolada do suco de casca de frutas cítricas (DURRENS, 2017), facilitou a investigação de características intrínsecas à espécie, capazes de serem aplicadas para fins tecnológicos.

Próximas filogeneticamente a *C. lusitaniae*, também foram identificadas neste trabalho linhagens de *Lodderomyces elongisporus*. Este micro-organismo foi associado com infecções sanguíneas pela primeira vez em 2007, e, devido a sua grande semelhança morfológica, acreditava-se que se tratava na verdade de *Candida parapsilosis* (LOCKHART et al., 2007). Desde então, foram constatados mais casos em que *L. elongisporus* foi relatada como causadora de fungemia, sendo o primeiro diagnóstico com métodos não moleculares identificava outra espécie de levedura. Logo, dada a grande similaridade morfológica entre as *L. elongisporus* e outras espécies, a identificação molecular se torna o caminho mais concreto para a correta identificação deste organismo.

Contudo, existe uma ampla variedade de habitats onde esse micro-organismo pode ser encontrado. Em uma pesquisa com o isolamento de leveduras a partir de sucos de frutas concentrados, linhagens de *L. elongisporus*, *C. lusitaniae* e *R. mucilaginosa*, correspondentes as três espécies identificadas nesta pesquisa, foram

isoladas de suco concentrado de maçãs, sendo um forte indício da sua capacidade de produção de aromas frutais, como o esperado para este trabalho (DEAK; BEUCHAT, 1993).

Finalmente, a segunda espécie com mais linhagens representantes dentre as 23 leveduras não-convencionais investigadas no presente trabalho foi identificada como *Rhodotorula mucilaginosa*. *Rhodotorula* sp. são leveduras pigmentadas, pertencentes a família *Sporidiobolaceae* (FELL et al., 2000). Das 37 espécies pertencentes ao gênero, 3 já foram relacionadas com infecções em humanos, sendo elas *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. minuta* e *R. glutinis* (BISWAS et al., 2001).

R. mucilaginosa, quando isolada em casos clínicos, normalmente é sequenciada por meio da amplificação das regiões ITS, correspondente a utilizada na atual pesquisa, ou das regiões D1/D2 do DNA (ARENDRUP, 2014). Mesmo também estando relacionada com casos de infecções em humanos, essa espécie tem propriedades biotecnológicas consideradas valiosas e por isso é bastante estudada, inclusive geneticamente.

4.2 POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS INDUSTRIAIS DAS LINHAGENS IDENTIFICADAS

Pesquisas em torno dos potenciais tecnológicos de *C. lusitaniae* aumentaram significativamente principalmente na última década. Pode-se citar diversos estudos, desde genes de *C. lusitaniae* expressados em outros organismos, tolerância à antifúngicos, como no presente trabalho, utilização dos seus bioprodutos em aplicações variadas e, principalmente estudos em relação à sua capacidade fermentativa de maneira geral.

Em uma pesquisa com o gene putativo da ene-redutase (ERs) da *C. lusitaniae*, expressado heterologicamente em *E. coli*, constatou-se que a proteína codificada, após purificação, apresenta propriedades biocatalíticas, principalmente envolvendo a redução de uma diversidade de alcenos ativados (NI et al., 2014).

Outros autores, ainda, relataram a capacidade da enzima α -amilase, extraída de uma linhagem de *C. lusitaniae*, de manter grande parte da atividade quando exposta a componentes de detergente e detergentes de roupa comerciais (RANJAN; LONE; SAHAY, 2016). Semelhantemente, em mais um trabalho com enzimas produzidas por *C. lusitaniae*, verificou-se a produção de α -L-ramnosidase, indicando

uma possível oportunidade de aplicação da linhagem no aprimoramento de qualidade de bebidas ou na desacidificação de sucos cítricos (SINGH; SAHOTA; SINGH, 2015).

Além disso, pesquisas demonstraram diferenças evolutivas entre *C. lusitaniae* e espécies de levedura relacionadas, como *Candida albicans*, gerando informações importantes quanto a investigação do mecanismo de reconfiguração da cromatina subtelomérica (FROYD et al., 2013).

Todavia, assim como as linhagens identificadas na atual pesquisa, que foram isoladas a partir de uma matriz alimentícia, demais pesquisadores também apontaram seu isolamento a partir de alimentos e bebidas e destacaram sua importante contribuição ao perfil aromático de tais produtos.

Pode-se citar como exemplos: o isolamento de *C. lusitaniae* a partir de manga (*Mangifera indica*) e de jambo-vermelho (*Syzygium malaccense*) (RAMÍREZ-CASTRILLÓN et al., 2019); a caracterização de *C. lusitaniae*, entre outras leveduras, isoladas do ambiente de produção de cachaça artesanal e do grão gasto, subproduto da indústria cervejeira, visando principalmente a futura aplicação dos micro-organismos identificados em bioprocessos (BREXÓ; ANDRIETTA; SANTANA, 2018); a identificação de *C. lusitaniae* no mosto de uva Monastrell, agindo na fermentação espontânea do processo de vinificação (OLIVA et al., 2020); o isolamento a partir de plantas cítricas para uso no biocontrole de doenças fúngicas pós-colheita em limões (PEREZ et al., 2016); sua identificação em *starters* autóctones de queijos (BINETTI et al., 2013), em *Agave salmiana* (ESCALANTE-MINAKATA et al., 2008) e no alimento fermentado de milho, *akamu* (OBINNA-ECHEM; KURI; BEAL, 2013).

Adicionalmente, *C. lusitaniae* também tem sido estudada como adsorvente de aflatoxina B1, como na pesquisa realizada por Magnoli e seus colaboradores (2016), em que esta foi isolada a partir de alimentos para frangos de corte e suas fezes. A linhagem demonstrou bons resultados de afinidade com a toxina, sugerindo que possa reduzir a biodisponibilidade de aflatoxina B1 ao nível do intestino e se mostrando uma interessante alternativa para o controle de aflatoxicose crônica na produção aviária.

Quanto ao potencial biotecnológico de linhagens de *L. elongisporus*, pode-se citar sua presença e contribuição ao aroma final de bebidas, estas que já receberam destaque durante o processo fermentativo de vinho, compondo a microbiota fermentativa do início da fermentação (RUIZ et al., 2019). Os autores ainda ressaltaram seu grande potencial enológico, principalmente devido a capacidade que o micro-organismo apresentou de se desenvolver nas condições de vinificação, como

em concentrações elevadas de etanol, além do impacto causado no produto final, este que obteve altas concentrações de 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol, e grande quantidade de proteínas.

Outros casos de isolamento desta espécie de levedura em fermentações de bebidas podem ser citados, como: seu isolamento dentre a microbiota presente na fermentação artesanal de milho para a produção de uma bebida tradicional dos povos indígenas do Brasil, denominada Chicha. *R. mucilaginosa* também estava presente neste ambiente (RESENDE et al., 2018); sua presença no processo fermentativo de leite fermentado matsoni, produto alimentar tradicional na Geórgia e na Armênia (BOKULICH et al., 2015); sua identificação, junto com a identificação de linhagens de *C. lusitaniae*, no preparo de licor com sabor forte na região de Yibin na China (YOU et al., 2016). Este licor é feito com cinco tipos de grãos cozidos no vapor, contendo sorgo, arroz glutinoso, arroz, trigo e milho. Os autores ainda evidenciaram importantes atividades enzimáticas extracelulares em linhagens de *L. elongisporus*, que apresentaram atividade de pectinase e LipA, além de degradarem celulose e amido e produzirem uma quantidade aproximada da produção real de etanol.

Nesse sentido, muito se tem estudado nas últimas décadas sobre as proteínas, principalmente enzimas produzidas por *L. elongisporus*, bem como sua expressão genética, propriedades, extração e purificação.

Entre as atividades enzimáticas frequentemente analisadas, tem-se avaliações do potencial lipolítico e a produção de lipases. Sobre este tema pode-se citar: o isolamento de linhagens de *L. elongisporus* e *C. lusitaniae* a partir de resíduos industriais de óleo de palma e alimentos fermentados tradicionais na Tailândia e a constatação dessas linhagens como possíveis alternativas de uso industrial para este fim, mesmo que não tenham sido as linhagens com maior atividade lipolítica deste ensaio (KUNCHAROEN et al., 2020); também em outro trabalho de isolamento de leveduras de ambientes marinhos produtoras de lipase, dentre as espécies isoladas identificaram-se linhagens de *L. elongisporus* e *R. mucilaginosa*, onde as linhagens de *L. elongisporus* apresentaram boa performance na hidrólise de azeite de oliva, óleo de amendoim e óleo de soja (WANG et al., 2007).

Ainda em relação às enzimas e proteínas, em geral, de *L. elongisporus*, muitos autores abordam a identificação e até a extração principalmente de aldo-ceto-redutases (NING; SU; WEI, 2014; WANG et al., 2014) e citocromo P-450 (RIEGE et al., 1981; MAUERSBERGER; SCHUNCK; MÜLLER, 1984).

Como observado, em grande parte desses estudos, as linhagens microbianas são isoladas a partir do meio ambiente. Então, é realizada a sua identificação taxonômica e investigado o seu potencial biotecnológico, assim como é o intuito da Coleção CMIB em relação às linhagens em depósito, incluindo *L. elongisporus* e as outras duas espécies de leveduras descritas aqui. O ambiente onde um micro-organismo é encontrado pode sugerir variadas atividades biotecnológicas relacionadas a ele.

Logo, ao isolar *L. elongisporus* de uma área ambiental contaminada ou prejudicada pela poluição, é possível que esta linhagem possa ajudar na biorremediação da área, como é o caso da linhagem isolada por Ma e seus colaboradores (2015) na plataforma petrolífera *offshore* no Mar da China Meridional. A linhagem de *L. elongisporus* isolada pelos autores apresentou taxa de degradação de petróleo de 51,2%, sendo maior do que grande parte das leveduras comumente isoladas do mar.

Estudos como este demonstram a capacidade da linhagem em utilizar outros substratos como fonte de carbono e energia, além da convencional glicose, sugerindo a utilização de diferentes vias metabólicas para o consumo das substâncias. Tal característica foi o ponto central do atual trabalho, incentivando o crescimento das linhagens em substratos semelhantes ao do seu habitat natural para verificar a possibilidade de consumo e degradação do substrato a novos compostos.

Outras rotas de degradação e assimilação de compostos pela linhagem já foram testadas na literatura, como a degradação de n-alcenos de cadeia longa via oxidação monoterminal do alceno (BLASIG et al., 1984) e a utilização de fontes alternativas de enxofre, incluindo sulfóxidos, sulfonas, sulfonatos, sulfamatos e ésteres de sulfato (LINDER, 2012).

Semelhantemente, há relatos de investigação de outras propriedades desta levedura como a capacidade de produção de ácidos tal como o ácido indol-3-acético, investigado a partir do isolamento de leveduras, incluindo *L. elongisporus* e *R. mucilaginosa*, do filoplano de cana-de-açúcar na Tailândia (LIMTONG et al., 2014); e produção de ácido clorogênico, formado pela via do ácido chiquímico em quase todas as plantas, por *L. elongisporus* isoladas de batata doce (*Ipomoea batatas*) e *Lonicera hypoglauca* (WANG et al., 2018).

Linhagens de *R. mucilaginosa* também já foram descritas a respeito de sua capacidade de enriquecer o aroma de alimentos e bebidas. Diversos relatos já foram

feitos por outros pesquisadores, como: sua aplicação na produção de aromas em queijos (MONTET; RAY, 2016); seu papel no perfil aromático de tapé de arroz glutinoso, uma iguaria popular da Indonésia, que também conta com *C. lusitaniae* e outras leveduras na composição sua comunidade microbiana (SOKA; IRENE, 2013); a presença desta linhagem em resíduos do leite de iaque, produto lácteo popular de Tibete na China (YANG et al., 2014); e, principalmente relatos de aprimoramento de aroma em vinhos, como pode ser visto a seguir.

A *R. mucilaginosa* foi anteriormente relatada como responsável na melhoria de características agradáveis do aroma de vinho branco seco “Ecolly”, acrescentando traços aromáticos florais e trufados à bebida, durante inoculação mista com *Saccharomyces cerevisiae* (WANG et al., 2017). Contudo, não é somente a cultura pura ou mista de *R. mucilaginosa* com outras linhagens que é investigada quanto ao seu potencial de melhoramento aromático em vinhos, mas também as enzimas produzidas por esse organismo.

Glicosidases extraídas de uma linhagem de *R. mucilaginosa* oriunda de uma região vinícola da China demonstraram alta tolerância às condições de vinificação e especificidade hidrolítica por glicosídeos 'frutados e florais' representados pelos de compostos benzênicos e C₁₃-norisoprenoides (HU et al., 2016). Também, durante o processo de vinificação de uva *Pinot noir*, constatou-se que os conteúdos voláteis do vinho foram afetados pelo tratamento com extratos extracelulares de *R. mucilaginosa* e *Pichia fermentans*, durante 6 meses, o que melhorou a intensidade do aroma floral da bebida (KONG et al., 2019).

Além das aplicações sensoriais na indústria alimentícia, a *R. mucilaginosa* vem sendo explorada como uma ferramenta de biocontrole da vida de prateleira de alguns frutos e vegetais. Semelhantemente às linhagens utilizadas no presente ensaio, alguns autores descrevem o seu isolamento a partir de maçãs e sucos de maçãs e, então, é realizada a verificação de dado potencial biotecnológico de cada linhagem.

A começar por problemas relacionados à qualidade das maçãs pós-colheita, como o aparecimento de mofos, estudos da última década mostram essa linhagem isolada de maçãs saudáveis e aplicada no controle do mofo-azul causado por *Penicillium expansum* (GHOLAMNEJAD; ETEBARIAN; SAHEBANI, 2010) e do mofo cinza (LI et al., 2011). Neste último trabalho, observou-se a diminuição da incidência

de podridão e do diâmetro da lesão causada por mofo cinzento e mofo azul após tratamento com *R. mucilaginosa*.

Outro problema na indústria da maçã, de grande relevância na segurança alimentar, é a micotoxina patulina, produzida por espécies de *Penicillium*. *R. mucilaginosa*, comum na maçã, como observado anteriormente, é reconhecida como importante contribuinte na defesa da maçã contra essa micotoxina. Análises mostraram que a levedura participou na indução da resposta de defesa da maçã aumentando a atividade de enzimas de defesa, como quitinase e β -1,3-glucanase. Além disso, verificou-se que a linhagem degradou parte da patulina, indicando o uso de outras vias metabólicas que estejam relacionadas a degradação deste composto. Adicionalmente, *R. mucilaginosa* apresentou mais uma vantagem: a capacidade de competir com o patógeno *P. expansum* por espaço e nutrientes, assim, prevenindo doenças na maçã causadas por este organismo (QIAN et al., 2020).

A aplicação de *R. mucilaginosa* para o biocontrole da qualidade de frutos e vegetais também já foi testada por meio da pulverização de células secas ativas de uma linhagem que foi originalmente isolada de Murta (goiaba chilena), contra o fungo *Botrytis cinerea*, responsável pelo mofo cinzento (GONZÁLEZ-ESPARZA et al., 2019) e em combinação com ácido salicílico contra podridão de mofo verde causada por *Penicillium digitatum* em laranjas (AHIMA et al., 2019).

Pode-se perceber que grande parte do interesse científico pela eficiência biotecnológica da *R. mucilaginosa* baseia-se na capacidade de degradação de variados compostos por este micro-organismo, bem como sua alta tolerância a ambientes limitados em nutrientes ou com substâncias que podem afetar a integridade microbiana.

Com linhagens de *R. mucilaginosa* isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos, alguns autores verificaram seu potencial de degradação de óleo diesel, via cultivo com óleo diesel como única fonte de carbono e a produção de enzimas responsáveis pelo processo de biodegradação deste composto (CHANDRAN; DAS, 2011).

Outros ambientes ou condições diferenciais em que esta linhagem foi encontrada, que reforçam sua tolerância e abrangência de substratos foram: em meios contendo trietanolamina ou dietanolamina como única fonte de nitrogênio (FATTAKHOVA; OFITSEROV; GARUSOV, 1991); isoladas a partir do lixiviado de uma

pilha de minerais de urânio (SILÓNIZ et al., 2002); formando biofilmes em metais pesados como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (GRUJIĆ et al., 2018), entre outros.

Por se tratar de uma levedura amplamente estudada no campo da biotecnologia, muitas aplicações foram ponderadas nos últimos anos, como por exemplo a recuperação de cobre, particularmente a partir de minérios alcalinos ou levemente neutros micro-organismo (RAJPERT; SKIODOWSKA; MATLAKOWSKA, 2013); a utilização do hidrolisado lignocelulósico por *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 para produção de lipídios microbianos (AYADI et al., 2019); e até mesmo a produção de frutooligossacarídeos por invertases de *R. mucilaginosa* (BARBOSA et al., 2018). Ainda, muitos autores abordam testes com linhagens de *R. mucilaginosa* mutadas ou genes da espécie expressados em organismos modelos como *E. coli* ou *S. cerevisiae*.

Em suma, é valioso para o centro de coleções CMRP possuir micro-organismos relevantes biotecnologicamente como estas três espécies, que já são amplamente estudadas mundialmente. Conforme observado, uma das principais características em comum entre as leveduras não-convencionais aqui identificadas é a presença destas em mosto de vinhos e as investigações quanto à sua influência no melhoramento do aroma final do produto.

Sabe-se que um dos principais constituintes aromáticos de uvas e, conseqüentemente, de vinhos, pertencem à classe dos compostos terpênicos. Logo, foi cabível que se houvesse a verificação das linhagens em depósito no centro do coleções CMRP quanto à sua relação com os terpenos, desde tolerância a até mesmo consumo deste composto.

Dado que os terpenos, de uma maneira geral, são empregados em diversos processos devido ao seu aroma e ao seu potencial bioativo, ressalta-se a descrição de sua relevância como um forte antimicrobiano em diversos estudos. Não há relatos na literatura de trabalhos envolvendo estas três espécies de leveduras não-convencionais sendo testadas quanto à tolerância ou consumo de α -terpineol.

Desta forma, conforme será apresentado no tópico a seguir, teve-se a missão de selecionar linhagens que fossem tolerantes a este composto, a fim de tornar esta investigação realizável.

4.3 DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS EM MEIO COM PRESENÇA DE ALFA-TERPINEOL

De acordo com os testes de pH realizados, dentre os valores de pH 5,0, pH 7,5 e pH 8,0 constatou-se que o pH ótimo de crescimento para os micro-organismos estudados foi o pH 5,0. Esta conclusão se deu em razão da observação do maior volume de desenvolvimento de células microbianas contadas por Câmara de Neubauer nestas condições. Logo, o pH 5,0 foi utilizado como padrão no caldo de cultivo para todas as 23 linhagens. Todas as leveduras foram cultivadas com a adição de 4 concentrações diferentes de α -terpineol. Para isso, o composto monoterpênico foi misturado a uma concentração de álcool etílico equivalente à sua própria, para que se tornasse mais miscível no meio líquido de cultivo.

Das 23 linhagens, 6 leveduras foram capazes de se desenvolver em meio com adição de 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de α -terpineol e 1 destas linhagens conseguiu se desenvolver também na concentração de 10,0 $\mu\text{L/mL}$ do composto, como mostrado na tabela a seguir.

Tabela 2 - Concentração máxima de α -terpineol tolerada pelas leveduras

Código*	Espécie	α-Terpineol ($\mu\text{L/mL}$)
CMIB 010	<i>Clavispora lusitanae</i>	2,5
CMIB 022	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	2,5
CMIB 033	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	2,5
CMIB 039	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2,5
CMIB 045	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2,5
CMIB 046	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2,5-10,0**

*Código interno da Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico; **Desenvolvimento de colônias somente pelo período de 12 horas. Fonte: Autoria Própria (2020).

Todavia, entre as linhagens selecionadas, 17 delas não foram capazes de se desenvolver na presença da concentração mínima de 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de α -terpineol. A morte dessas leveduras pode ter ocorrido devido ao fato de elas terem sido afetadas pelo α -terpineol, visto que este é reconhecido em diversos estudos pelas suas propriedades antimicrobianas.

Park et al. (2009) estudaram o efeito deste composto quando aplicado a fungos filamentosos e constataram que as hifas do fungo *Trichophyton mentagrophytes* foram morfológicamente afetadas. Ao ser tratado com uma

concentração de α -terpineol de 0,5 mg/mL, *T. mentagrophytes* teve sua membrana mitocondrial interna parcialmente destruída, enquanto a membrana mitocondrial externa aparentava estar sofrendo desintegração, mostrando sua morfologia distorcida. Em uma concentração maior, de 1 mg/mL de α -terpineol, observou-se que as hifas do fungo filamentosas expostas ao composto estavam vacuoladas e demonstravam estar sofrendo lise celular. Esses resultados evidenciam o impacto que este composto monoterpênico é capaz de causar na morfologia fúngica, mesmo que, neste estudo, o tratamento com α -terpineol não tenha inibido completamente o crescimento microbiológico.

No entanto, para o fungo filamentosas *Penicillium digitatum*, o composto monoterpênico foi mais nocivo. A concentração mínima inibitória desta linhagem foi de 2,00 μ L/mL (JING et al. 2015), pouco inferior à concentração mínima de α -terpineol utilizada no presente estudo: 2,5 μ L/mL. Os pesquisadores testaram concentrações de 0,25 μ L/mL a 8,0 μ L/mL de α -terpineol e relataram que, todavia, em concentrações inferiores a 1,00 μ L/mL, o composto mostrou atividade antifúngica apenas moderada contra o *P. digitatum*.

Assim como observado por Park e seus colaboradores, JING e outros (2015), observaram que o α -terpineol evidentemente modificou a hifa do fungo estudado, o que, por consequência, culminou na perda do seu citoplasma e na distorção do micélio. Com o aumento da permeabilidade da membrana houve a liberação de constituintes celulares e diminuição do conteúdo lipídico total das células, apontando a destruição das estruturas da membrana. Foi possível aos autores concluir que o α -terpineol causou a inibição do crescimento fúngico por meio dos danos ocasionados na síntese da parede celular do *P. digitatum*, que impediram a reconstrução desta e levaram-na a sua ruptura.

Em um estudo realizado por Pinto e outros autores (2014) foi testada a eficiência antifúngica de um óleo essencial, sendo um dos maiores constituintes o α -terpineol, ante fungos filamentosos e leveduras patogênicas. Com isso, assemelhando-se ao salientado pelos outros autores, percebeu-se grande atividade fungicida dos compostos. Ao testarem o α -terpineol sozinho como antimicrobiano, descobriu-se que as concentrações mínimas inibitórias para as leveduras variaram entre 0,32 μ L/mL, 0,64 μ L/mL e 1,25 μ L/mL, concentrações menores do que as do atual trabalho. Pinto e seus colaboradores, ainda, relataram que o α -terpineol tinha o

mesmo potencial de atividade fungicida que o óleo essencial total, o que evidencia a eficácia desta substância para este fim.

Deste modo, em busca de tentar elucidar o mecanismo da toxicidade do composto terpênico aos micro-organismos que tiveram seu crescimento inibido no atual trabalho, tem-se que os hidrocarbonetos lipofílicos, tal qual o α -terpineol, acabam se acumulando na bicamada lipídica da membrana. Esse acúmulo acarreta danos nas propriedades estruturais e funcionais dessas membranas, tendo como consequência uma membrana com sua integridade diminuída ou destruída, além do aumento do transpasse de prótons e íons. Ainda, estudos concluem que até mesmo as proteínas que se encontram incorporadas às membranas podem ser atingidas. Esses e outros fatores, envolvidos nas alterações do ambiente lipídico da membrana, são os responsáveis por impedir o desenvolvimento das células microbianas sensíveis a esses compostos (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

No entanto, assim como bactérias, os fungos filamentosos e leveduriformes também são capazes de desenvolver mecanismos de defesa contra antimicrobianos (SOUSA et al., 2016), o que reflete os resultados de screening apresentados pelas 6 leveduras estudadas aqui que foram capazes de se desenvolver na presença do α -terpineol.

Entre as leveduras tolerantes ao composto antifúngico, uma delas, a CMIB 46 (*Rhodotorula mucilaginosa*), foi capaz de tolerar a maior concentração de α -terpineol (10,0 $\mu\text{L/mL}$), porém só resistiu pelo período de 12 horas. As características morfológicas e taxonômicas desta linhagem correspondem às características de duas outras linhagens, CMIB 45 e CMIB 39, que também se desenvolveram com a presença deste composto, contudo tolerando apenas a concentração de 2,5 $\mu\text{L/mL}$.

De maneira geral, entre as leveduras, grande destaque é dado para a produção de carotenoides pelas leveduras do gênero *Rhodotorula*, gênero destas três linhagens discutidas aqui. A sobrevivência das leveduras da espécie *R. mucilaginosa* em contato com o composto monoterpênico, mesmo que em concentrações baixas (2,5 $\mu\text{L/mL}$) ou em concentrações mais altas (10,0 $\mu\text{L/mL}$) por apenas 12 horas pode ser consequência da utilização de rotas de produção de terpenos como os carotenóides pelo micro-organismo.

Com efeito, carotenóides são pigmentos terpenóides pertencentes a família dos tetraterpenos. Amplamente distribuídos pela natureza, estes compostos correspondem a um isoprenoide C40 e podem ser produzidos por bactérias, fungos,

algas e plantas (MAOKA, 2019; BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 2004). Fundamentalmente, um terpenóide tem sua síntese a partir do isopentenilpirofosfato (IPP), seu precursor de 5 carbonos e, dessa maneira, teve por muitos anos, como sua única rota de obtenção conhecida, a síntese a partir do mevalonato (HABTEMARIAM, 2019). Mesmo com o posterior conhecimento de rotas alternativas de obtenção, nos fungos a produção de terpenóides é normalmente dada pela rota do mevalonato (SCHMIDT-DANNERT, 2014).

Por conseguinte, ter leveduras com a capacidade de utilização de uma rota metabólica para síntese de terpenóides, como as estudadas, é um bom indicativo da razão pela qual elas foram capazes de tolerar certa concentração do composto monoterpênico aplicado.

Entretanto, mesmo se tratando de três linhagens de leveduras da mesma espécie, é necessário reforçar que a linhagem CMIB 46 sobreviveu apenas 12 horas em qualquer concentração do monoterpeno, mesmo na concentração mais baixa de 2,5 $\mu\text{L/mL}$, enquanto as outras duas linhagens sobreviveram na menor concentração testada por no mínimo 48 horas.

A diferença de comportamento observada entre linhagens de levedura da mesma espécie pode ser justificada pela variabilidade genética. De maneira geral, todos os indivíduos de uma população podem se distinguir devido aos seus genótipos, sendo essa diferença genética conhecida como variabilidade genética. A variabilidade genética, portanto, vem a demonstrar as variações existentes entre populações de organismos, estas que refletem diferentes e, geralmente exclusivas, características em cada espécie ou indivíduo em si de acordo com sua hereditariedade e o ambiente em que estão inseridas. Em virtude das variações, as espécies podem apresentar particularidades que influenciam na sua sobrevivência, como a suscetibilidade a doenças tóxicas ou lesões (BEEDANAGARI et al., 2014).

A variação dentro de uma população pode ser dada a partir de três princípios, sendo eles recombinação, imigração de genes e mutação. Todavia, com exceção da mutação, as outras duas bases, recombinação e imigração precisam de determinadas condições para causar variações. Para a recombinação causar variação, os alelos precisam estar segregando em loci diferentes, para que haja algo a recombinar, ao passo que a imigração de genes somente pode proporcionar uma variação se a espécie toda for homozigótica para o mesmo alelo (GRIFFITHS et al., 2000).

Todavia, para inferir que realmente houve variabilidade genética entre as linhagens do presente trabalho, seria necessária a construção de árvores filogenéticas com a utilização de mais genes, de forma a confirmar que a diferença comportamental entre os micro-organismos se deu pela sua classificação em diferentes subgrupos.

Nesse sentido, cabe ao presente trabalho tentar levantar hipóteses que justifiquem o desenvolvimento da linhagem CMIB 46 por apenas 12 horas. Uma das hipóteses para este comportamento, é que, como apresentado anteriormente que o α -terpineol tende a se acumular na camada bilipídica da membrana dos micro-organismos, esta linhagem tenha apresentado certo mecanismo de defesa a princípio dificultando o acúmulo deste composto, porém não conseguindo manter essa defesa por mais de 12 horas. Outra hipótese é que a presença desta linhagem em contato com o composto monoterpênico possa indicar uma degradação enzimática.

Ainda, visando as informações descritas anteriormente, quanto a produção de carotenoides por espécies de *Rhodotorula*, levantou-se a hipótese da linhagem estar consumindo o composto terpenóide, característica abordada na seção seguinte, e ao mesmo tempo estar produzindo compostos que sejam tóxicos para si mesma, permitindo seu desenvolvimento somente nas primeiras 12 h. Para que a linhagem consuma o α -terpineol, entretanto, a glicose do meio deveria ter sido consumida rapidamente pelos micro-organismos, uma vez que se trata de um açúcar, componente de mais fácil assimilação como fonte de carbono e energia pelas leveduras (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006). Porém, dentro de um período tão curto de tempo as leveduras poderiam consumir seu próprio carbono reserva como fonte energia, o que torna esta hipótese menos provável. Para melhor verificar o comportamento fisiológico da CMIB 46 e comprovar alguma destas hipóteses, considera-se interessante fazer um teste com concentrações crescentes de α -terpineol em contato com o micro-organismo.

As outras três linhagens que apresentaram tolerância a menor concentração de α -terpineol (2,5 μ L/mL) pertencem a duas espécies, sendo uma das linhagens *Clavispora lusitaniae* e as outras duas *Lodderomyces elongisporus*.

DESNOS-OLLIVIER et al., (2011) relataram a resistência induzida de isolados de *C. lusitaniae* perante equinocandina, um forte antifúngico utilizado no tratamento de infecções causadas por importantes patógenos, tal quais os da linhagem utilizada. Por se tratar de um composto que afeta a síntese da parede celular, as linhagens

resistentes apresentaram uma mutação que configurou essa resistência ao antifúngico.

Da mesma forma, indica-se que a linhagem de *C. lusitaniae* do presente estudo, capaz de resistir a uma pequena concentração de α -terpineol possa ter passado por uma mutação, visto que esta não foi a única linhagem da espécie *C. lusitaniae* testada, mas foi a única que demonstrou resistência ao antifúngico. O mesmo aconteceu com as linhagens de *L. elongisporus*, visto que, das 3 linhagens, somente duas foram capazes de se desenvolver na presença de 2,5 μ L/mL de α -terpineol por pelo menos 48 horas.

Tratando-se de uma linhagem algumas vezes isolada a partir de casos clínicos, teste com antimicrobianos mais comumente empregados em casos de fungemia já foram feitos com *L. elongisporus* e pacientes contaminados com esta levedura. Ao ser tratada com Caspofungin, por exemplo, a linhagem se demonstrou susceptível a uma baixa concentração de antifúngico, todavia houve casos em que, mesmo com o tratamento com tal composto, o paciente veio a óbito durante a infecção (AL-OBAID et al., 2018). É importante considerar fatores de risco de cada paciente, mas também é necessário avaliar a eficiência dos antifúngicos sob *L. elongisporus*.

Desde que uns dos objetivos do trabalho era analisar a tolerância dos isolados de *L. elongisporus* ao composto, esse é um resultado promissor para a aplicação deste micro-organismo em processos na indústria biotecnológica que envolvam a presença deste composto até a concentração de 2,5 μ L/mL, assim como as outras linhagens que se mostraram resistentes. Além disso, essa se mostra uma característica genética interessante de ser investigada posteriormente em casos de linhagens geneticamente modificadas.

De maneira geral, as três linhagens, *R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae* e *L. elongisporus*, foram encontradas em mais de uma vez isoladas juntas em um mesmo habitat por diversos autores, até mesmo na vinificação da uva, em que um dos compostos aromáticos mais presentes são os compostos terpênicos. No atual trabalho, com as linhagens isoladas a partir da maçã, a exposição destas a terpenos, mesmo que baixa ainda existiu visto que esta classe de compostos é um dos componentes aromáticos do fruto. Isso pode sugerir que estas três espécies leveduriformes possam trabalhar em conjunto, como em um consórcio microbiano, podendo promover algum mecanismo que favoreça a sua resistência a compostos previamente nocivos a cada linhagem. Não é possível comprovar essa afirmação com

base nos resultados obtidos, mas considera-se interessante deixar-se a sugestão de testes com as três linhagens juntas ante α -terpineol em diferentes concentrações.

Com as 6 linhagens resistentes, então, prosseguiu-se para a avaliação da capacidade de consumo deste composto como sua única fonte de carbono e energia.

4.4 CONSUMO DE ALFA-TERPINEOL PELAS LEVEDURAS

As tabelas 2 e 3 e as figuras 7A, 7B e 7C apresentam os valores de Rf e as imagens da corrida cromatográfica nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD), respectivamente, utilizadas para avaliar o consumo de α -terpineol pelas leveduras. As linhagens de levedura CMIBs: 10, 22, 33, 39, 45 e 46, as quais se mostraram tolerantes à pelo menos uma das concentrações de α -terpineol (Tabela 1), foram submetidas ao cultivo em meio mineral com α -terpineol e as amostras foram coletadas após 0, 12, 24, 36 e 48 h de incubação.

Tabela 3 - Resultados dos controles positivos da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.

Código na placa	Identificação CP	Concentração α -T (%)	Rf
C1	Controle 1	0,125	0,0059 0,2412
C2	Controle 2	0,25	0,0059 0,2412
C3	Controle 3	0,5	0,0059 0,2588
C4	Controle 4	0,75	0,0059 0,2705

CP: Controle Positivo; α -T: α -terpineol Fonte: Autoria Própria (2020).

Tabela 4 - Resultados da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD

(continua)

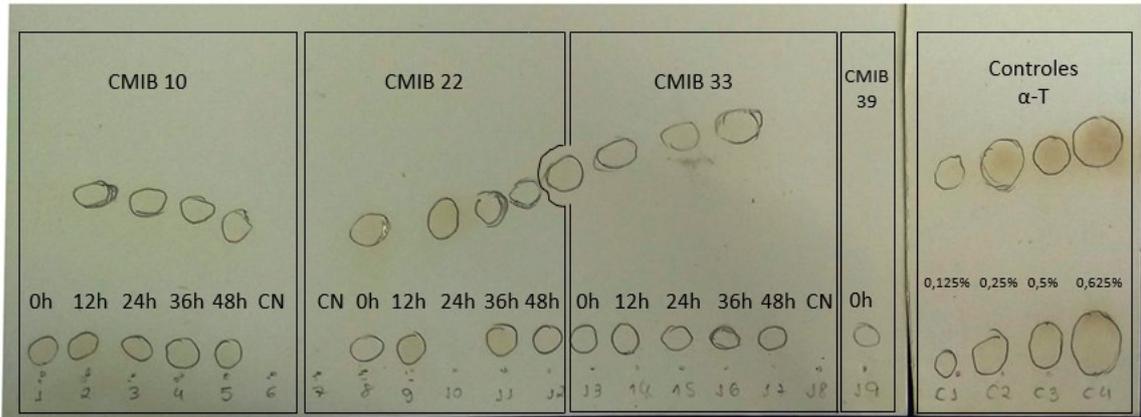
Código na placa	Espécie (CMIB)	Tempo de incubação (h)	Rf
1		0	0,118
2		12	0,0176 0,2176
3	<i>C. lusitaniae</i>	24	0,0176 0,2059
4	(CMIB 10)	36	0,0118 0,2000
5		48	0,0118 0,1765
6		Controle negativo	-
7		Controle negativo	-

Tabela 4 - Resultados da primeira remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD

			(conclusão)
Código na placa	Espécie (CMIB)	Tempo de incubação (h)	Rf
8		0	0,0118 0,1647
9	<i>L. elongisporus</i>	12	0,0059
10	(CMIB 22)	24	0,1765
11		36	0,0176 0,1941
12		48	0,0235 0,2176
13		0	0,0235 0,2412
14		12	0,0235 0,2705
15	<i>L. elongisporus</i>	24	0,0235 0,2882
16	(CMIB 33)	36	0,0235 0,2941
17		48	0,0235
18		Controle negativo	-
19		0	0,0294
20		12	0,2588
21	<i>R. mucilaginosa</i>	24	0,0235 0,2470
22	(CMIB 39)	36	0,0118 0,2412
23		48	0,0059 0,2529
24		Controle negativo	-
25		0	-
26		12	0,2647
27	<i>R. mucilaginosa</i>	24	0,0059 0,2588
28	(CMIB 45)	36	0,0059 0,2647
29		48	0,2588
30		Controle negativo	-
31		0	0,0059 0,1941
32		12	0,0059 0,1882
33	<i>R. mucilaginosa</i>	24	0,0059 0,1941
34	(CMIB 46)	36	0,1941
35		48	0,0059 0,1882
36		Controle negativo	-
37		Controle negativo 2	-

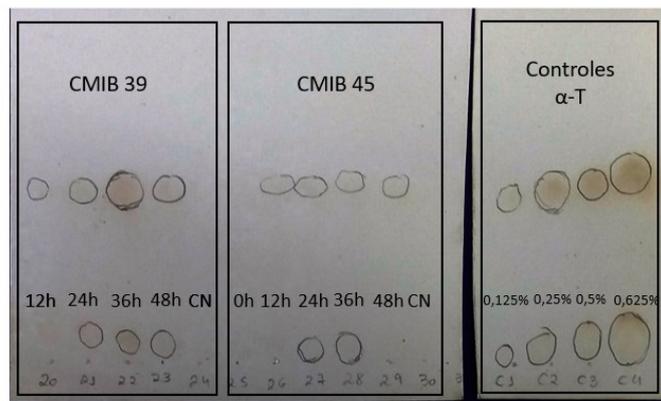
Controle negativo: cultivo da levedura sem α -terpineol, coletado após 48 horas de incubação; Controle negativo 2: meio de cultura esterilizado. Fonte: Aútoría Própria (2020).

Figura 7A - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 10, 22 e 33, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos



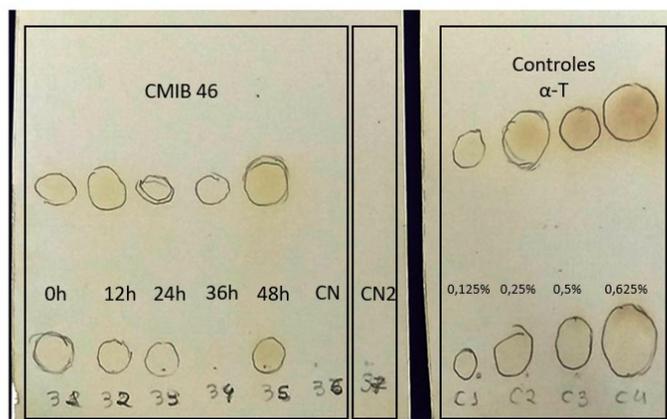
CN: controle negativo de α -terpineol; pontos identificados como C1, C2, C3 e C4 referem-se ao controle de α -terpineol nas diluições de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 0,625% respectivamente. Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 7B - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 39 e 45, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos



CN: controle negativo de α -terpineol; pontos identificados como C1, C2, C3 e C4 referem-se ao controle de α -terpineol nas diluições de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 0,625% respectivamente. Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 7C - Placa de CCD mostrando resultados da primeira remessa de amostras, CMIB 46, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos



CN: controle negativo de α -terpineol; pontos identificados como C1, C2, C3 e C4 referem-se ao controle de α -terpineol nas diluições de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 0,625% respectivamente. Fonte: Autoria própria (2020)

Observando as figuras, pode-se analisar o resultado visual de comportamento das amostras. Tem-se que nas figuras 7A, 7B e 7C, vinte das amostras obtiveram duas manchas durante a corrida de CCD, uma próxima ao ponto de aplicação e outra mais acima na placa, comportamento semelhante ao apresentado pelos controles positivos de α -terpineol.

Segundo os princípios da técnica de CCD, considerando a sílica-gel utilizada como fase estacionária e a sua polaridade, as manchas que não percorreram uma maior distância na placa interagiram mais com a sílica-gel, portanto sendo substâncias mais polares do que as manchas que percorreram uma distância maior por interagirem mais com a fase móvel. Deste modo, nestas vinte amostras e nos controles positivos de α -terpineol, pode-se identificar a presença de dois compostos, sendo um polar e um menos polar. Os valores menos polares, no entanto, podem ser referentes ao spot de aplicação de parte do composto que não migrou devido a sua polaridade.

Oito das amostras apresentaram somente uma mancha durante a separação de substâncias, sendo que três delas revelaram apenas as manchas de uma substância polar e cinco delas relevaram somente as manchas que representam uma substância menos polar.

Das amostras que apresentaram apenas a substância polar, que pode se tratar de uma possível mancha do spot de aplicação, duas delas foram da coleta no tempo inicial (0h) das amostras, sendo elas CMIB 10 – *C. lusitaniae* (Figura 7A) e CMIB 39 – *R. mucilaginosa* (Figura 7B), outra foi referente à coleta de 12 horas da amostra CMIB 22 – *L. elongisporus* (Figura 7A) e a última foi a coleta de 48 h da CMIB 33 – *R. mucilaginosa* (Figura 7A). Os valores de Rf correspondentes ao composto apresentado por cada uma dessas amostras foram 0,118, 0,0294, 0,0059 e 0,0235 respectivamente. Com exceção do último valor, os outros dois ficaram acima dos valores de Rf para a substância polar das amostras controle de α -terpineol.

Visto que a maioria delas se trata de coletas iniciais dos cultivos e as amostras coletadas após maior tempo de incubação apresentaram duas manchas, tal qual os controles positivos, sugere-se que estas amostras tenham enfrentado algum erro ou problema durante a homogeneização na coleta, extração após a coleta ou ainda aplicação da amostra na placa. A respeito da amostra CMIB 33, por esta não apresentar o composto menos polar na coleta de 48 h, considerando que todas as

coletas anteriores desta linhagem apresentaram, foi realizado um novo teste (Tabela 5, Figura 7), que será explicado posteriormente.

Em contrapartida, dentre as cinco amostras que revelaram somente a mancha de caráter menos polar, duas delas são referentes às coletas de 12 horas dos CMIBs 39 ($R_f = 0,2588$) e 45 – *R. mucilaginosa* – ($R_f = 0,2647$) (Figura 7B), uma relacionada à coleta de 24 horas do CMIB 22 ($R_f = 0,1765$) (Figura 7A), uma relacionada à coleta de 36 horas do CMIB 46 – *R. mucilaginosa* – ($R_f = 0,1941$) (Figura 7C) e a restante refere-se à última coleta, de 48 horas, do CMIB 45 ($R_f = 0,2588$) (Figura 7B). Em relação aos valores de R_f dos controles de α -terpineol, os compostos apresentados pelos CMIB 22 e 46 tiveram valores significativamente inferiores a todos os padrões, enquanto os compostos dos CMIBs 39 e 45 de 48h obtiveram valores de R_f iguais ao controle C3, que estava na diluição de 0,5% de α -terpineol. Ainda o composto obtido pela amostra CMIB 45 na coleta de 12 horas ($R_f = 0,2647$) apresentou um resultado que ficou entre os valores de R_f do C3 ($R_f = 0,2588$) e do C4 ($R_f = 0,2705$).

Em virtude de quatro das manchas dos tempos não-finais (12h, 24h e 36h) de coleta para as amostras CMIBs 22, 39, 45 e 46 terem as amostras seguintes a estas nas placas (Figuras 7A, 7B e 7C) com o comportamento esperado segundo o controle positivo, sugere-se que estas tenham sido envolvidas nos mesmos problemas citados para as amostras anteriores que continham apenas o composto polar.

Todavia, o fato da amostra que se refere à coleta de 48 horas de cultivo da CMIB 45 ter obtido apenas uma mancha, representando somente um composto diferentemente das amostras controle, pode representar um possível consumo do composto polar pelo micro-organismo em cultivo. Além disso, o composto menos polar desta amostra teve valor de R_f superior ao controle de α -terpineol correspondente a concentração de monoterpeneo incluída no meio de cultura, o controle C2. Desta forma, isso poderia indicar também uma possível produção do composto menos polar pela linhagem, porém necessitaria de mais testes, principalmente em relação ao tempo de cultivo, e replicações da amostra para atestar tal afirmação.

Por fim, oito das amostras não apresentaram nenhuma mancha, sendo seis delas o cultivo controle sem α -terpineol de cada levedura, uma delas o controle do meio de cultura esterilizado e a última delas referente ao tempo de 0 hora do CMIB 45 (Figura 7B), que se supõe ter sido afetado durante a extração das amostras.

Em relação à intensidade das manchas, pode-se observar pelas amostras de controle positivo de α -terpineol que à medida que ocorre aumento da concentração do

composto, a intensidade de coloração das manchas aumenta também. O controle C2 é o controle onde o α -terpineol está na mesma concentração em que foi utilizado nos cultivos microbiológicos. Logo, visualmente constatam-se cinco pontos que demonstraram intensidade de cor mais aproximada à cor desse controle, sendo as coletas de 12, 24 e 36 horas do CMIB 22 (Figura 7A), 36 horas do CMIB 39 (Figura 7B) e 48 horas do CMIB 46 (Figura 7C). Todas as outras amostras apresentaram coloração semelhante ao controle positivo C1, menos concentrado, ou coloração ainda menos intensa.

Todavia, quanto à variação de intensidade com referência ao tempo de incubação das amostras, observou-se que os CMIBs 10, 33 e 45 mantiveram a mesma intensidade de cor de manchas desde o momento de incubação até 48 horas depois, indicando que a concentração dos compostos manifestados pode ter continuado a mesma, não havendo o consumo do composto pelo micro-organismo. Entretanto, tal afirmação é somente um indicativo de resultado baseado em características visuais da análise de CCD, necessitando de outras técnicas que comprovem e descartem qualquer interferência inerente a esta metodologia, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, conforme realizado por Llorens-Molina et al. (2017), ao identificar α -terpineol na análise de compostos do óleo essencial de *Mentha longifolia* L.

Da mesma forma, o CMIB 22 (Figura 7A) manteve a intensidade de cor até a coleta de 48 h, quando decaiu e ficou menos intensa e o CMIB 46 (Figura 7C), em contrapartida, manteve intensidade mediana na maior parte das coletas e teve manchas mais intensas na coleta de 48 h. Novamente, o primeiro caso pode ser um indicativo de consumo dos compostos presentes e o segundo pode se tratar do aumento na concentração desse composto, mas não é possível afirmar com total segurança sem o auxílio de análises complementares. Além disso, entende-se que, se tratando de compostos voláteis, a probabilidade de interferências na separação por cromatografia em camada delgada é ainda maior.

Finalmente, o CMIB 39 (Figura 7B) demonstrou resultados inconclusivos na relação entre tempo de cultivo e intensidade das manchas, uma vez que houve um aumento de intensidade na coleta 36 h e novamente redução na última coleta 48 h.

Quanto a separação e identificação dos compostos verificados de acordo com a sua posição na placa de CCD (Figuras 7A, 7B e 7C) e seus valores de R_f (Tabela

3), constatou-se que grande parte das amostras apresentou manchas em alturas semelhantes uma com a outra e com o controle positivo de α -terpineol (Tabela 2).

De forma a se obter esclarecimento sobre os compostos observados durante a corrida de cromatografia em camada delgada, tem-se na literatura referências de valores de Rf correspondentes ao α -terpineol em análises por CDD, onde o resultado foi complementado por técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Horváth e seus colaboradores (2013) encontraram valores de Rf de 0,24 para o α -terpineol e Wagner; Bladt (2009) também citaram valores de Rf de 0,25 para o mesmo composto, dados condizentes com os encontrados aqui nas amostras controle C1, C2 e C3.

Das amostras analisadas no presente trabalho, os CMIBs 33 (*L. elongisporus*), 39 e 45 (*R. mucilaginoso*) apresentaram resultados dentro desta faixa de valores. Os CMIBs 39 e 45 apresentaram certa instabilidade nos valores de Rf durante o período de incubação variando entre 0,24 e 0,25 e entre 0,25 e 0,26 respectivamente. Essa variação pode ter sido ocasionada devido as quantidades trabalhadas serem muito baixas e o composto ser altamente volátil. Todavia, percebe-se que para fins de constatação do composto trabalhado, esses valores não variaram significativamente e ainda foram condizentes aos valores citados por outros autores para o α -terpineol.

A amostra CMIB 33, no entanto, visivelmente apresentou manchas que se deslocaram mais para a direção menos polar conforme aumentou o tempo de cultivo (Figura 7A), o que foi evidenciado pelo seu Rf que cresceu gradativamente de 0,24 a 0,29 durante as coletas. Adicionando ao fato desta amostra não ter apresentado a mancha menos polar na coleta de 48 h de cultivo, resolveu-se repetir os testes com esta linhagem, a fim de confirmar os resultados encontrados.

Os CMIBs 10 (*C. lusitanae*), 22 (*L. elongisporus*) e 46 (*R. mucilaginoso*) apresentaram todos os valores de Rf, desde a coleta 0h, inferiores aos Rf das amostras controle, portanto também inferiores aos dados encontrados na literatura. Os CMIBs 10 e 22 alcançaram o resultado de 0,21 e o CMIB 46 demonstrado um valor máximo de 0,19 de Rf. Esses valores variaram mais substancialmente em relação aos valores esperados pelas amostras controle mesmo que não tenham variado muito entre si. Novamente, uma vez que o Rf destas amostras esteve baixo e apresentou variações e instabilidade desde a coleta no início (0 hora), esse resultado pode ter

sido causado devido à baixa quantidade e alta volatilidade do composto monoterpênico.

Contudo, a amostra CMIB 46, durante a incubação, foi a que apresentou a maior produção de biomassa nos tubos, em cultivo com α -terpineol e, por ser a linhagem que apresentou desenvolvimento em contato com uma maior concentração deste composto, optou-se por repetir os testes com esta linhagem também.

Para a repetição dos testes com as linhagens CMIBs 33 e 46, de *L. elongisporus* e *R. mucilaginosa*, adotaram-se algumas práticas diferentes das utilizadas na primeira realização da técnica. Assim sendo, utilizou-se uma placa cromatográfica dividida em duas partes para que a placa não dobrasse dentro da cuba ou se encaixasse em seu formato, interferindo na velocidade ou na distância de movimentação dos compostos. Outra medida aderida foi a de aleatorizar a ordem de aplicação das amostras, de forma a confirmar os resultados principalmente da CMIB 33 que, conforme mencionado anteriormente, apresentou aumento gradativo de Rf. Após estas alterações, as novas placas apresentaram valores de Rf muito mais uniformes do que a primeira análise, como é visível na Tabela 4 e na Figura 8, a seguir, principalmente contrastando com os resultados apresentados pelo CMIB 33 no primeiro teste (Figura 7A).

Tabela 5 - Resultados dos controles positivos da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.

Código na placa	Identificação CP	Concentração α -T (%)	Rf
4	Controle 1	0,125	0,0029 0,4375
7	Controle 2	0,25	0,0062 0,4437
11	Controle 3	0,5	0,0133 0,4067
13	Controle 4	0,75	0,0067 0,4200

CP: Controle Positivo; α -T: α -terpineol Fonte: Autoria Própria (2020).

Tabela 6 - Resultados da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.

(continua)

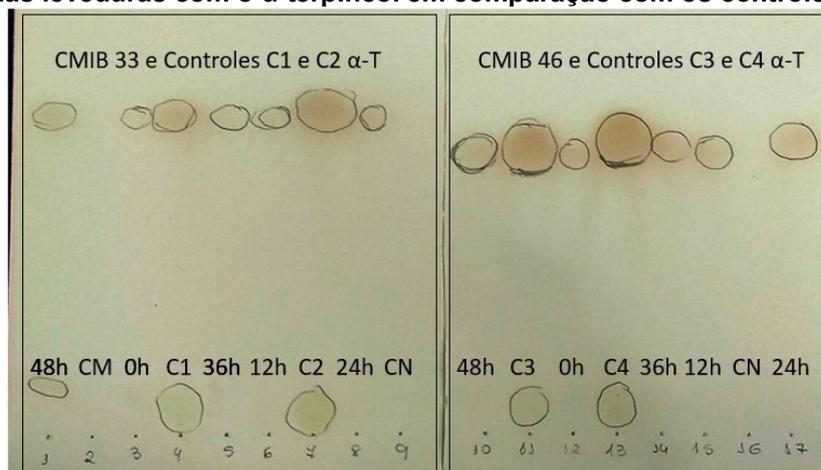
Código na placa	Espécie (CMIB)	Tempo de incubação (h)	Rf
3	<i>Lodderomyces</i>	0	0,4437
6	<i>elongisporus</i>	12	0,4500
8	(CMIB 33)	24	0,4437

Tabela 6 - Resultados da segunda remessa de amostras com valores de Rf encontrados por cada aplicação na placa de CCD.

			(conclusão)
Código na placa	Espécie (CMIB)	Tempo de incubação (h)	Rf
5	<i>L. elongisporus</i>	36	0,4437
1	(CMIB 33)	48	0,0562 0,4437
9		Controle negativo	-
12		0	0,4133
15	<i>Rhodotorula</i>	12	0,4100
17	<i>Mucilaginosa</i>	24	0,4267
14	(CMIB 46)	36	0,4200
10		48	0,4067
16		Controle negativo	-
2		Controle negativo 2	-

Controle negativo: cultivo da levedura sem α -terpineol, coletado após 48 horas de incubação; **Controle negativo 2:** meio de cultura esterilizado. Fonte: Aatoria Própria (2020).

Figura 8- Placa de CCD mostrando resultados da segunda remessa de amostras, CMIB 33 e 46, do cultivo das leveduras com o α -terpineol em comparação com os controles positivos.



CN: controle negativo de α -terpineol; **CM:** controle do meio de cultura esterilizado; pontos identificados como C1, C2, C3 e C4 referem-se ao controle de α -terpineol nas diluições de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 0,675% respectivamente. Fonte: Aatoria própria (2020)

Percebe-se, a princípio, que a alteração nos parâmetros fez grande diferença nos resultados. Inclusive, uma diferença notável foi percebida também no valor de Rf dos novos testes, que mostraram, mesmo para os controles C1 ao C4, valores iguais ou superiores a Rf = 0,40. A principal modificação técnica entre a primeira realização da análise e esta nova repetição é que a distância percorrida pelo solvente na atual corrida foi 1 cm menor do que a análise em CDD anterior. Logo, com o carregamento de compostos acontecendo em um espaço menor na placa, é natural que a distância

percorrida pelo composto seja maior em relação ao teste anterior, que teve um espaço superior para o deslocamento das amostras.

Embora os valores de R_f encontrados ($R_f \geq 0,40$) sejam divergentes aos valores encontrados anteriormente com as 6 linhagens ($R_f \leq 0,29$), observa-se que os valores estão dentro dos controles padrão de α -terpineol da análise cromatográfica atual, permitindo a comparação de resultados com os padrões aplicados.

De maneira geral, pode-se observar que na atual análise, quase todas as amostras apresentaram somente manchas representativas do composto menos polar, com exceção da amostra da coleta de 48 h do CMIB 33. O R_f do composto polar ($R_f = 0,0562$), na coleta de 48 h, é ligeiramente maior do que todos os R_f das amostras controle. Em contrapartida, todos os controles de α -terpineol demonstraram a presença de pelo menos dois compostos, sendo um polar e um menos polar. Novamente, ressalta-se que as manchas que não apresentaram deslocamento podem ser referentes ao spot de aplicação da amostra.

Para o CMIB 33, o R_f do composto menos polar ($R_f = 0,4437$) se manteve estável até a última coleta da amostra e, desta forma, com valor igual ao R_f do controle C2, que teoricamente possui a mesma concentração de α -terpineol utilizada no cultivo das linhagens ($2,5 \mu\text{L/mL}$). Para a amostra CMIB 46, os valores de R_f não apresentaram variação muito significativa e se mantiveram dentro dos valores de referência dos controles C3 e C4.

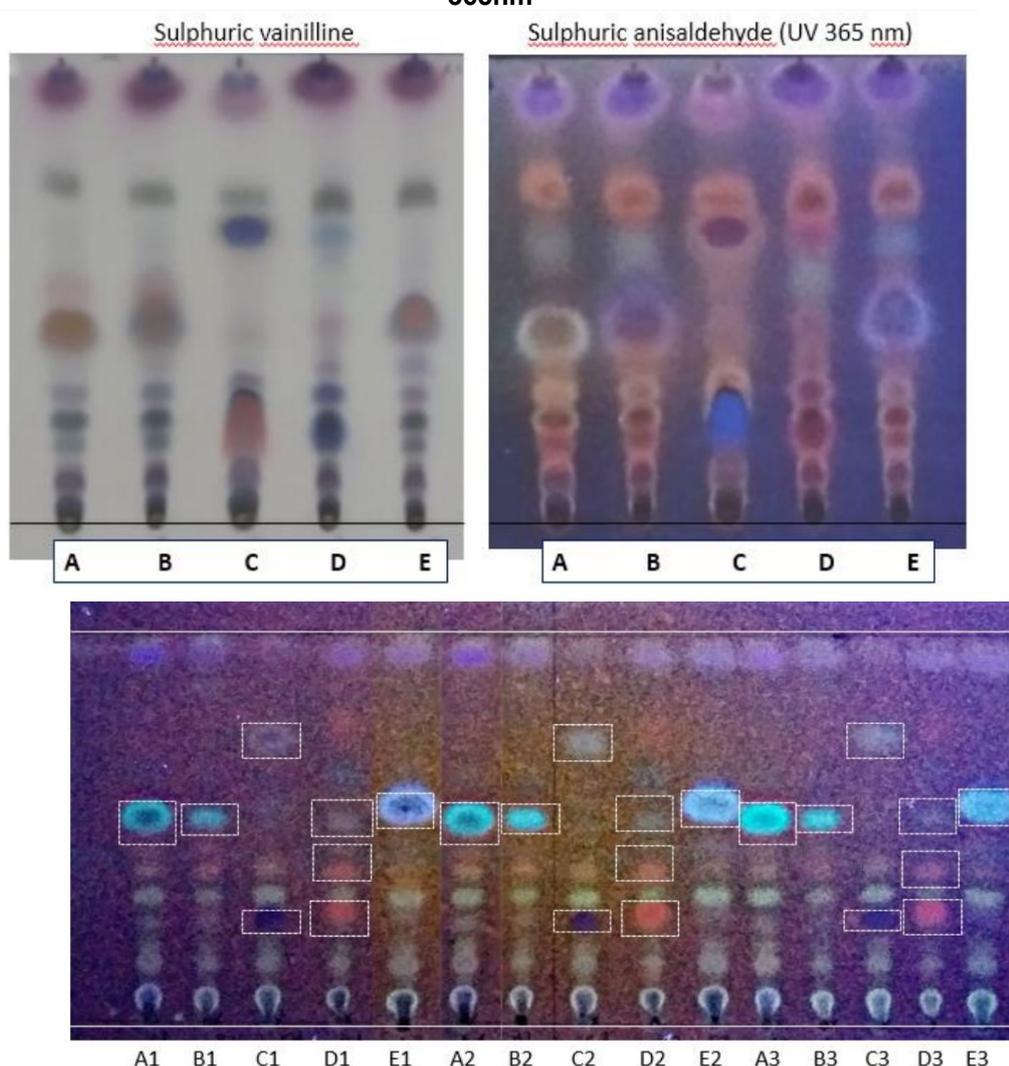
A intensidade de cor das manchas de todas as amostras também se manteve estável, no entanto, estas se apresentaram mais suaves até mesmo do que a amostra controle com menor concentração, o controle C1.

As situações de cada uma das amostras, tanto a de não apresentação de composto polar na amostra CMIB 46 quanto o aparecimento de um composto polar com R_f maior do que o R_f dos controles de α -terpineol na coleta de 48 h do CMIB 33, podem indicar uma metabolização ou produção de novo composto por estas leveduras.

Porém, isso pode significar também que os compostos apenas estivessem em concentração baixa não possível de ser detectada por CCD, logo necessitando de confirmação destes resultados por CG/MS, visto que a cromatografia gasosa é uma técnica com mais sensibilidade para separar compostos voláteis (FOCANT; SJÖDIN; PATTERSON, 2004) e o espectrômetro de massas confirmaria a identidade do composto.

Llorens-Molina et al. (2017), no seu trabalho sobre identificar os quimiotipos de óleo essencial de *Mentha longifolia* L., também utilizou anisaldeído sulfúrico para a pulverização, e obteve os resultados das imagens a seguir.

Figura 9 - Exemplos de manchas obtidas em análises de quimiotipos de óleo essencial com uso de vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico como pulverizadores e visualização em luz UV 365nm



Fonte: Llorens-Molina et al. (2017)

Dentre os compostos encontrados pelos autores, estava o acetato de α -terpineol, que apresentou Rf de 0,68 – 0,76 e, quando exposto à luz UV em 365 nm e cor de mancha descrita como “branco sujo”. Pode-se observar que, em exposição a luz UV de tal comprimento de onda, muitos compostos puderam ser mais bem observados e reconhecidos, incluindo as cores esperadas e demonstradas por cada classe de compostos nesta condição. Na pesquisa atual, não foi possível visualizar as

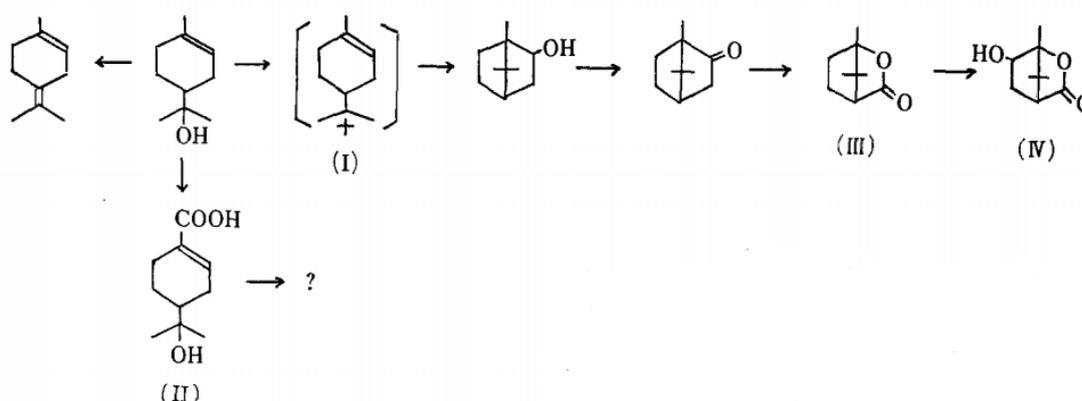
placas em luz UV após pulverização com o anisaldeído sulfúrico, podendo ter sido omitido algum composto de baixa concentração que fosse visível somente sob tais condições.

Na imagem da Figura 9 ainda, percebe-se que alguns dos compostos tiveram menor concentração e apresentaram manchas menos largas e mais bem separadas em relação ao trabalho atual.

Quanto aos compostos esperados da degradação do α -terpineol, muitos trabalhos relatam a degradação deste composto e sugerem a utilização de diferentes rotas metabólicas por alguns organismos.

Uma bactéria encontrada no solo, *Pseudomonas aeruginosa*, foi estudada na biodegradação de α -terpineol, onde foi relatada a conversão do composto monoterpênico em borneol e terpinoleno como produtos catabólicos neutros. Os autores sugeriram que o borneol seja produzido como um intermediário na via de degradação do α -terpineol. Após muitos cultivos, ainda, a linhagem conseguiu assimilar o borneol e produzir vários metabólitos neutros e um produto ácido (TADASA, 1977). O esquema da reação de degradação esboçado pelo autor é demonstrado a seguir.

Figura 10 – Esquema da via de degradação do α -terpineol ao borneol por *P. aeruginosa*

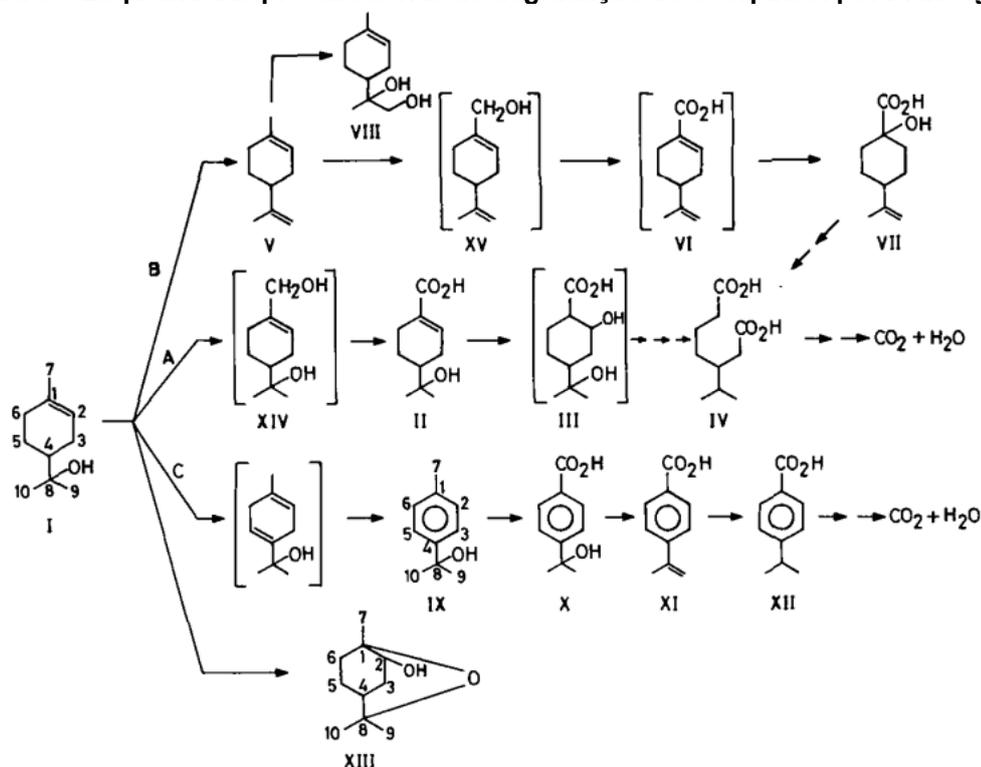


Fonte: Tadasa (1977)

Shukla; Moholay; Bhattacharyya (1968) identificaram o ácido oleuropeico como um produto de α e β -pinenos degradado por *Pseudomonas* sp. do solo e apontaram que o ácido oleuropeico foi produzido por meio da degradação do α -terpineol.

A degradação do α -terpineol por *P. incognita* também apresentou o ácido oleuropeico como um dos produtos, bem como diversos metabólitos ácidos e neutros. Dentre os metabólitos ácidos, foi possível identificar o ácido beta-isopropil pimérico, ácido 1-hidroxi-4-isopropenil-ciclohexano-1-carboxílico, ácido 8-hidroxicumico, ácido oleuropeico, ácido cúmico e ácido p-isopropenil benzóico. Em contrapartida, os metabólitos neutros foram identificados como limoneno, p-cimeno-8-ol, 2-hidroxicineol e uroterpenol. Com isso, os autores indicam que existe a possibilidade de a linhagem degradar o α -terpineol por pelo menos três vias diferentes, sendo uma delas via o ácido oleuropeico, outra relacionada a aromatização do α -terpineol e a outra podendo estar associada à formação de limoneno (MADYASTHA; RENGANATHAN, 1984). As prováveis vias de degradação representadas pelos autores estão expressas na figura 11.

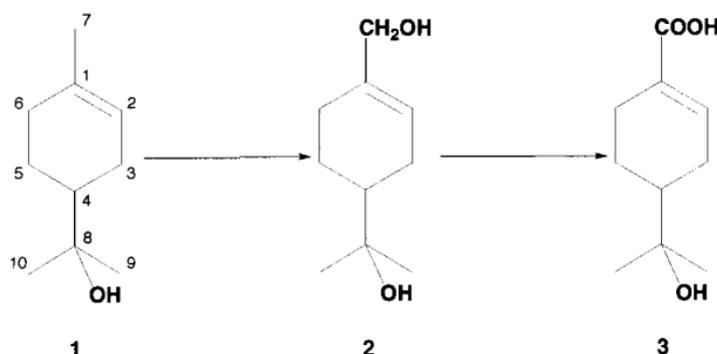
Figura 8 – Esquema das prováveis vias de degradação do α -terpineol por *P. incognita*



I: α -terpineol; II: ácido oleuropeico; III: ácido 2,8-dihidroxi-pmentanoico; IV: ácido P-isopropilpimérico; V: limoneno; VI: ácido perílico; VII: 1-hidroxi-4-isopropenil ciclo-hexano-1-ácido carboxílico; VIII: uroterpenol; IX: p-cimeno-8-ol; X: ácido 8-hidroxicumico; XI: ácido p-isopropenil benzóico; XII: ácido cúmico; XIII: 2-hidroxicineol; XIV: álcool oleuropílico; e XV: álcool perílico. Fonte: Madyastha; Renganathan (1984)

O ácido oleuropeico também foi encontrado na degradação de α -terpineol pela larva da lagarta comum (*Spodoptera litura*). Outro produto encontrado foi o 7-hidroxi- α -terpineol (p-menth-1-eno-7,8-diol) (MIYAZAWA; OHSAWA, 2002).

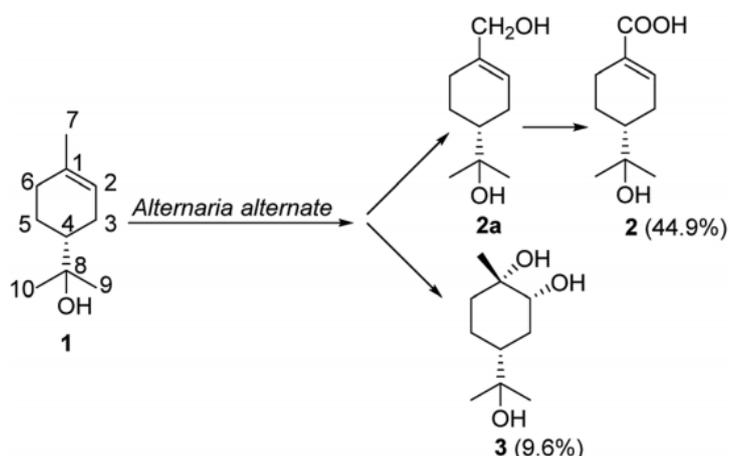
Figura 12 – Esquema da possível via de degradação do α -terpineol por larvas de *S. litura*



Fonte: Miyazawa; Ohsawa (2002)

Em fevereiro deste ano, foi publicado o primeiro estudo da biotransformação do α -terpineol por fungos. Ao verificar a capacidade de biotransformação de nove fungos patogênicos, constatou-se que o fungo *Alternaria alternata* foi capaz de biotransformar este composto. Assim como o encontrado para a degradação realizada por outros organismos, foi identificada a conversão do α -terpineol em ácido 4R-oleuropeico e a presença de 7-hidroxi- α -terpineol como um intermediário oxidativo. Identificou-se também como produto de degradação o (1S, 2R, 4R) -p-mentano-1,2,8-triol, um derivado cis-dihidroxila (MEI et al., 2020).

Figura 13 – Esquema da biotransformação do α -terpineol pelo fungo *Alternaria alternata*



2: ácido 4R-oleuropeico; 3: (1S, 2R, 4R) -p-mentano-1,2,8-triol. Fonte: Mei et al. (2020)

Tais produtos poderiam estar sendo produzidos pelas linhagens do atual trabalho, se comprovado o consumo do composto terpênico por estas. Com isso, ressalta-se a necessidade de novas verificações de consumo do α -terpineol pelas leveduras com o uso de técnicas auxiliares de análise.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação molecular das 23 leveduras não-convencionais produtoras de bioaromas utilizadas no presente trabalho, constatou que 12 destas linhagens pertencem à espécie *Clavispora lusitaniae*, 8 representam a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* e as 3 restantes referem-se à espécie *Lodderomyces elongisporus*. Após a construção de árvores filogenéticas que, principalmente, confirmassem a identificação molecular das linhagens, obtida por meio da comparação com sequências de bancos de dados biológicos, constatou-se que as linhagens de *C. lusitaniae* e *L. elongisporus* são mais próximas geneticamente entre si do que com as linhagens de *R. mucilaginosa*.

Depois do cultivo das linhagens com 4 concentrações diferentes de α -terpineol (2,5 $\mu\text{L/mL}$, 5,0 $\mu\text{L/mL}$, 7,5 $\mu\text{L/mL}$ e 10,0 $\mu\text{L/mL}$) observou-se que apenas 6 do total de linhagens testadas se mostraram tolerantes à concentração de 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de α -terpineol. Uma destas linhagens, no entanto, demonstrou tolerância também à concentração de 10,0 $\mu\text{L/mL}$, mas em todas as concentrações só foi capaz de sobreviver pelo período de 12 horas. As linhagens que apresentaram resistência ao α -terpineol foram identificadas como *C. lusitaniae* (n=1), *L. elongisporus* (n=2) e *R. mucilaginosa* (n=3).

A levedura que tolerou todas as concentrações de α -terpineol por 12 horas, inclusive a concentração mais alta de 10,0 $\mu\text{L/mL}$, foi uma das 3 linhagens tolerantes de *R. mucilaginosa*. Algumas hipóteses foram levantadas para tal comportamento: uma delas de que seu mecanismo de defesa tenha sido capaz de prevenir os danos à membrana da levedura por apenas 12 horas, que tenha havido degradação enzimática do composto por parte da linhagem, ou uma hipótese menos provável de que tenha havido a produção de compostos tóxicos para a linhagem após haver o consumo de α -terpineol pela mesma.

Com a avaliação do consumo do composto terpênico por estas linhagens por meio da cromatografia em camada delgada, em primeira análise obtiveram-se variações para todas as amostras, porém acreditou-se que as linhagens CMIB 46 (*R. mucilaginosa*) e CMIB 33 (*L. elongisporus*) apresentaram resultados interessantes em produção de biomassa durante o cultivo e pontos visualizáveis na placa cromatográfica. Para identificar possíveis condições inerentes à técnica, foram feitas alterações sobre alguns parâmetros. Todavia, após a repetição do cultivo, coleta e

análise sob novas condições para estas linhagens, obtiveram-se resultados inconclusivos. Supõe-se que isso tenha ocorrido principalmente em razão da baixa concentração das amostras e do próprio composto terpênico, visto que este foi manuseado conforme capacidade de resistência microbiana. Sugere-se que deve-se haver mais investigações quanto a este tópico.

Por fim, sugere-se futuramente o uso de técnicas que possam ter uma maior sensibilidade em relação às baixas concentrações em análise, como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, específica para este fim, de forma a desvendar o consumo do composto pelas linhagens.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros a análise do consumo de α -terpineol com o auxílio de técnicas auxiliares como a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Ademais, para o cultivo das linhagens utilizadas no presente trabalho, recomenda-se testar os CMIBs 45 (*R. mucilaginosa*) e 33 (*L. elongisporus*) com um tempo maior de cultivo com o α -terpineol durante o período de provável consumo do composto.

Ainda, indica-se testar o consumo do composto monoterpênico utilizando um consórcio com as 3 espécies de leveduras (*C. lusitaniae*, *L. elongisporus* e *R. mucilaginosa*) visto que estas espécies foram originalmente encontradas juntas na maçã, cujo um dos compostos aromáticos é a classe dos terpenos e existem diversos trabalhos, principalmente relacionados ao aroma de vinhos, onde as mesmas foram encontradas coabitando o mesmo local.

Outra opção seria utilizar extratos enzimáticos das leveduras para então avaliar os processos de biodegradação, podendo assim utilizar diferentes concentrações de α -terpineol sem depender diretamente da resistência apresentada por cada linhagem de levedura.

Visto que não foi possível realizar o escalonamento das amostras de forma a simular condições mais próximas às industriais, em virtude das capacidades disponíveis durante a realização da pesquisa, propõe-se testar mais concentrações (inferiores e superiores às utilizadas anteriormente) de α -terpineol. Também propõe-se testar o tempo máximo exato em que estas linhagens conseguem se desenvolver na presença deste composto.

Além disso, recomenda-se a realização de testes de adaptação das leveduras que tiveram resultado positivo a maiores concentrações do composto monoterpênico, efetuando-se ensaios de pré-adaptação com concentrações crescentes de α -terpineol, a fim de prepará-las mais consistentemente para sua inserção em processos industriais.

Sugere-se também, o levantamento do provável caminho de degradação do composto terpênico dentro do metabolismo leveduriforme, para, futuramente, considerar se alguma destas linhagens teria o potencial para a utilização desta característica em outros micro-organismos, com o uso da engenharia genética.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, J.; ZHANG, X.; YANG, Q.; ZHAO, L.; TIBIRU, A. M.; ZHANG, H. Biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* combined with salicylic acid against *Penicillium digitatum* infection in oranges. **Biological Control**, [s.l.], v. 135, p. 23-32, ago. 2019.
- ALDRED, E. M.; BUCK, C.; VALL, K. Terpenes. In: ALDRED, E. M.; BUCK, C.; VALL, K. (Eds.), **Pharmacology**, p.167-174. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2009.
- ALMEIDA, C. P.; ROCHA, J. C.; CARITÁ, J. S.; SOUZA, T. M. A.; SOUZA, P. V. S. Biotecnologia na Produção de Alimentos. **Dossiê Técnico**. Universidade de São Paulo - USP Inovação. dez. 2011. Disponível em:
<<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY3Ng==>>
Acesso em: 25 jan. 2020
- ALMEIDA, L. de. **Gestão da coleção microbiológica de interesse biotecnológico na UTFPR Ponta Grossa**. 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.
- AL-OBAID, K.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, Z. *Lodderomyces elongisporus*: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. **New Microbes And New Infections**, [s.l.], v. 26, p. 20-24, nov. 2018.
- ARENDRUP, M. C.; BOEKHOUT, T.; AKOVA, M.; MEIS, J. F.; CORNELLY, O. A.; LORTHOLARY, O. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 20, p. 76-98, abr. 2014.
- AYADI, I.; BELGHITH, H.; GARGOURI, A.; GUERFALI, M. Utilization of Wheat Bran Acid Hydrolysate by *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for Microbial Lipid Production as Feedstock for Biodiesel Synthesis. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2019, p. 1-11, dez. 2019.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 89-105, jan. 2008.
- BAPTISTELLA, L. H. B.; IMAMURA, P. M.; MELO, L. V. M.; CASTELLO, C. Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpênos de odor

agradável em um projeto para química orgânica experimental. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 1069-1071, fev. 2009.

BARBOSA, P. M. G.; MORAIS, T. P. de; SILVA, C. A. de A.; SANTOS, F. R. da S.; GARCIA, N. F. L.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R.; PAZ, M. F. da. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. **Preparative Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 506-513, jun. 2018.

BEEDANAGARI, S.; VULIMIRI, S. V.; BHATIA, S.; MAHADEVAN, B. Genotoxicity biomarkers: molecular basis of genetic variability and susceptibility. **Biomarkers In Toxicology**, [s.l.], p. 729-742, 2014.

BERGER, R. G. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.1651-1659, 16 jul., 2009.

BICAS, J. L.; SILVA, J. C.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 1. Campinas, p. 7-18, jan.-mar. 2010.

BINETTI, A.; CARRASCO, M.; REINHEIMER, J.; SUÁREZ, V. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 115, n. 2, p. 434-444, 7 jun. 2013.

BISWAS, S. K.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 1191-1199, mai. 2001.

BLASIG, R.; SCHUNCK, W. H.; JOCKISCH, W.; FRANKE, P.; MÜLLER, H. G. Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Lodderomyces elongisporus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 19, p.241-246, 1984.

BOEKHOUT, T. Gut feeling for yeasts. **Nature**, [s.l.], v. 434, n. 7032, p. 449-451, mar. 2005.

BOKULICH, N. A.; AMIRANASHVILI, L.; CHITCHYAN, K.; GHAZANCHYAN, N.; DARBINYAN, K.; GAGELIDZE, N.; SADUNISHVILI, T.; GOGINYAN, V.;

KVESITADZE, G.; TOROK, T. Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 50, p. 12-19, set. 2015.

BOMBARDELLI, E.; CAIROLI, G. **Compositions for the treatment of atopic dermatitis, skin allergic conditions and acne**. Titular: Indena S.P.A. US n. 7597915B2. Depósito: 8 nov. 2004. Concessão: 6 out. 2009.

BOMMARIUS A. S.; RIEBEL-BOMMARIUS B. R. **Biocatalysis: Fundamentals and Applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: **Biotecnologia**. 2019. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/informma/item/7510-biotecnologia.html>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

BREXÓ, R. P.; ANDRIETTA, M. G. S.; SANT'ANA, A. S. Artisanal cachaça and brewer's spent grain as sources of yeasts with promising biotechnological properties. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 125, n. 2, p. 409-421, maio, 2018.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (ed.). **Carotenoids: handbook**. Basileia: Springer Basel Ag, 2004. 649 p.

CAMPBELL, I. M. Secondary Metabolism and Microbial Physiology. **Advances in Microbial Physiology**. v. 25, [s.l.], p. 1-60, 1985.

CAPUTI, L.; APREA, E. Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry. Recent Patents On Food, **Nutrition & Agriculture**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 9-16, 1 jan. 2011.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 645-652, nov. 2011.

DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Yeasts Associated with Fruit Juice Concentrates. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 777-782, set. 1993.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VAN BELLEGHEM, K.; KIMPE, N. de. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 199-208, maio 2001.

DESNOS-OLLIVIER, M.; MOQUET, O.; CHOUAKI, T.; GUÉRIN, A. M.; DROMER, F. Development of Echinocandin Resistance in *Clavispora lusitaniae* during Caspofungin Treatment. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.2304-2306, 13 abr. 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, 3. ed. John Wiley & Sons Ltd, 2009.

DEY, P M; HARBONE, J B. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. 554 p.

DURRENS, P.; KLOPP, C.; BITEAU, N.; FITTON-OUHABI, V.; DEMENTHON, K.; ACCOCEBERRY, I.; SHERMAN, D. J.; NOËL, T. Genome Sequence of the Yeast *Clavispora lusitaniae* Type Strain CBS 6936. **Genome Announcements**, [s.l.], v. 5, n. 31, p. 1-2, ago. 2017.

ESCALANTE-MINAKATA, P.; BLASCHEK, H.P.; LAROSA, A. P. B. de; SANTOS, L.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A. de. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcals fermentation of *Agave salmiana*. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 6, p. 626-630, jun. 2008.

ETSCHMANN, M.; BLUEMKE, W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 1-8, jun. 2002.

FATTAKHOVA, A. N.; OFITSEROV, E. N.; GARUSOV, A. V. Cytochrome P-450-dependent catabolism of triethanolamine in *Rhodotorula mucilaginosa*. **Biodegradation**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 107-113, 1991.

FELDMANN, H. (ed.). **Yeast: molecular and cell biology**. 2. ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2012. 464 p.

FELL, J. W. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 50, n. 3, p. 1351-71, 2000.

FERRARA, M. A.; SIANI, A. C.; BON, E. P. da S. Processos de bioconversão aplicados à obtenção de fármacos e intermediários, p. 137 -172. In: **Biociencia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

FILHO, W. G. V. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. v. 1, 2. ed., São Paulo: Blucher, 2018. 575 p.

FISHER, C.; SCOTT, T. R. **Food Flavours: Biology and Chemistry**. Londres: Royal Society of Chemistry, 2019. 176 p.

FLEET, G. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 86, n. 1-2, p.11-22, 1 set. 2003.

FOCANT, J. F.; SJÖDIN, A.; PATTERSON, D. G. Improved separation of the 209 polychlorinated biphenyl congeners using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1040, n. 2, p. 227-238, jun. 2004.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, [s.l.], v. 112, n. 2, p. 231-240, fev. 2008.

FROYD, C. A.; KAPOOR, S.; DIETRICH, F.; RUSCHE, L. N. The Deacetylase Sir2 from the Yeast *Clavispora lusitaniae* Lacks the Evolutionarily Conserved Capacity to Generate Subtelomeric Heterochromatin. **Plos Genetics**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1-17, out. 2013.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. San Francisco: Freeman, Cooper & Company, 592 p. 1969.

GHOLAMNEZHAD, J.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **African Journal of Food Science**. v. 4, n.1, p. 1-7, jan. 2010.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M. Life with 6000 Genes. **Science**, [s.l.], v. 274, n. 5287, p. 546-567, out. 1996.

GONZÁLEZ-ESPARZA, A.; AH-HEN, K. S.; MONTENEGRO, O.; BRICEÑO, E.; STEVENSON, J.; ALVARADO, R.; GENTINA, J. C. Survival of Spray-Dried *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated from Natural Microbiota of Murta Berries and Antagonistic Effect on *Botrytis cinerea*. **Food Technology And Biotechnology**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 222-229, mar. 2019.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **An Introduction to Genetic Analysis**. 7. ed. New York: W. H. Freeman, 2000. 816 p.

GRUJIĆ, S. M.; RADOJEVIĆ, I. D.; VASIĆ, S. M.; ČOMIĆ, L. R.; OSTOJIĆ, A. M. Heavy metal tolerance and removal efficiency of the *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces boulardii* planktonic cells and biofilm. **Kragujevac J. Sci.** v. 40, p. 217-226, mai. 2018.

GUICHARD, E.; SALLES, C.; MORZEL, M.; LE BON, A. M. **Flavour: From Food to Perception**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 424 p.

GUSMÃO, A. O. M.; SILVA, A. R.; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v.16, n. 1, p. 135 - 154, 2017.

HABTEMARIAM, S. Introduction to plant secondary metabolites—From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action. **Medicinal Foods As Potential Therapies For Type-2 Diabetes And Associated Diseases**, [s.l.], p. 109-132, 2019.

HASSAN, S. B.; GALI-MUHTASIB, H.; GÖRANSSON, H.; LARSSON, R. Alpha Terpineol: A Potential Anticancer Agent which Acts through Suppressing NF-κB Signalling. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1911-1919, jun. 2010.

HOLT, S.; MIKS, M. H.; CARVALHO, B. T. de; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 43, n. 3, p. 193-222, 15 nov. 2018.

HOLZSCHU, D. L.; PRESLEY, H. L.; MIRANDA, M.; PHAFF, H. J. Identification of *Candida lusitanae* as an opportunistic yeast in humans. **J. Clin. Microbiol.** v. 10, p. 202–205, 1979.

HORVÁTH, G.; KOCSIS, B.; LEMBERKOVICS, É.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; OTT, P.; MÓRICZ, Á. Detection of antibacterial activity of essential oil components by TLC-bioautography using luminescent bacteria. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 114-118, abr. 2013.

HU, K.; ZHU, X.L.; MU, H.; MA, Y.; ULLAH, N.; TAO, Y. S. A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine

aroma enhancement. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 169-176, jan. 2016.

HUA, D.; XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 654-660, nov. 2011.

ILC, T.; WERCK-REICHHART, D.; NAVROT, N. Meta-Analysis of the Core Aroma Components of Grape and Wine Aroma. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 1-15, set. 2016.

JANSSENS, L.; POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.195-215, jul. 1992.

JING, G. X; TAO, N. G.; JIA, L.; ZHOU, H. E. Influence of α -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*. **Botanical Studies**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 1-6, dez. 2015.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 17, p. 7563-7577, jul. 2013.

JUNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**. v. 26, n. 3, p. 390-400, jun. 2003.

KALLEL-MHIRI, H.; ENGASSER, J. M.; MICLO, A. Continuous ethyl acetate production by *Kluyveromyces fragilis* on whey permeate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 40, n. 2-3, p. 201-205, nov. 1993.

KHALEEL, C.; TABANCA, N.; BUCHBAUER, G. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open Chem**. v. 16, n. 1, p. 349-361, 2018.

KIDD, S.; HALLIDAY, C.; ALEXIOU, H.; ELLIS, D. **Descriptions of Medical Fungi**. 3. ed. Australia: Newstyle Printing, 2016. 278 p.

KIRBY, R.; DOWNING, T. G.; GOHARY, M. I. E. (ed.). **Fundamentals of Biochemistry, Cell Biology and Biophysics**. Abu Dhabi: Eolss Publications, 2010. 334 p.

KNORR, D.; SINSKEY, A. J. Biotechnology in Food Production and Processing. **Science**, [s.l.], v. 229, n. 4719, p.1224-1229, set. 1985.

KONG, C. L.; LI, A. H.; JIN, G. J.; ZHU, X. L.; TAO, Y. S. Evolution of volatile compounds treated with selected non-*Saccharomyces* extracellular extract during Pinot noir winemaking in monsoon climate. **Food Research International**, [s.l.], v. 119, p. 177-186, mai 2019.

KRĘGIEL, D.; PAWLIKOWSKA, E.; ANTOLAK, H. Non-Conventional Yeasts in Fermentation Processes: potentialities and limitations. **Old Yeasts - New Questions**, [s.l.], p. 1-7, dez. 2017.

KUNCHAROEN, N.; TECHO, S.; SAVARAJARA, A.; TANASUPAWAT, S. Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. **Mycology**, [s.l.], p. 1-8, mar. 2020.

LACHANCE, M. A. *Clavispora* Rodrigues de Miranda (1979). **The Yeasts**, [s.l.], p.349-353, 2011.

LAFFEY, S. F. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, [s.l.], v. 151, n. 4, p.1073-1081, abr. 2005.

LARONE, D. H. **Medically important fungi**. 4. ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2002. 409 p.

LÉON, R.; FERNADES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Enzyme. **Microb. Technol.** v. 23, p. 483, 1998.

LI, R.; ZHANG, H.; LIU, W.; ZHENG, X. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 146, n. 2, p. 151-156, mar. 2011.

LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; YONGMANITCHAI, W.; KAWASAKI, H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1785-1796, jan. 2014.

LINDER, T. Genomics of alternative sulfur utilization in ascomycetous yeasts. **Microbiology**, [s.l.], v. 158, n. 10, p. 2585-2597, out. 2012.

LLORENS-MOLINA, J. A.; CASTELL, V.; VACAS, S.; VERDEGUER, M. TLC-GC/MS Method for identifying and selecting valuable essential Oil Chemotypes from Wild Populations of *Mentha longifolia* L. **Nat. Volatiles & Essent. Oils**, v. 4, n. 4, p. 49-61, 2017.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 374-376, out. 2007.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. **Food Technol. Biotechnol.** v. 44, n. 3, p. 335–353, mar. 2006.

MA, C.; LIU, J.; ZHOU, T.; WEI, M.; HAN, H.; CHENG, S.; ZENG, X.; YIN, A.; LIU, Z.; CHENG, C. Identification and Phylogenetic Analysis of Two Marine Petroleum-Degrading Yeasts from South China Sea Offshore Based on Magnetic Nanoparticles Extraction. **Journal Of Bionanoscience**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 215-221, jun. 2015.

MADYASTHA, K. M.; RENGANATHAN, V. Metabolism of alpha-terpineol by *Pseudomonas incognita*. **Can. J. Microbiol.** v. 30, n. 12, p. 1429-36, dez. 1984.

MAGNOLI, A. P.; RODRIGUEZ, M. C.; POLONI, V. L.; ROJO, M. C.; COMBINA, M.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. Novel yeast isolated from broilers' feedstuff, gut and faeces as aflatoxin B1 adsorbents. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 121, n. 6, p. 1766-1776, nov. 2016.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal Of Natural Medicines**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 1-16, out. 2019.

MARTINS, R. L.; VEIGA-SANTOS, P.; CASTILHO, S. G. **Fermentação divertida: introdução à ciência através de atividade culinária investigativa**. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2014.

MAUERSBERGER, S.; SCHUNCK, W. H.; MÜLLER, H. G. The induction of cytochrome P-450 in the alkane-utilizing yeast *Lodderomyces elongisporus*:

Alterations in the microsomal membrane fraction. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 19, p.29-35, 1984.

McMURRY, J. E. **Organic Chemistry with Biological Applications**. 3a ed. Cengage Learning, 2014. 1224 p.

MEI, R. F.; SHI, Y. X.; DUAN, W. H.; DING, H.; ZHANG, X. R.; CAI, L.; DING, Z. T. Biotransformation of α -terpineol by *Alternaria alternata*. **RSC Advances**, v. 10, n. 11, p.6491-6496, fev. 2020.

MERCK CHEMICAL WORKS (org.). **Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**. Darmstadt: Merck, 1971.

MIKHEYEV, A. S. **PEG purification of PCR products**. (2009). Disponível em <https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=PEG_purification_of_PCR_products&oldid=364070> Acesso em 18 out. 2020.

MIYAZAWA, M.; OHSAWA, M. Biotransformation of alpha-terpineol by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **J Agric Food Chem**. v. 50, n. 17, p. 4916-4918, ago. 2002.

MØLLER, K.; CHRISTENSEN, B.; FÖRSTER, J.; PISKUR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Aerobic glucose metabolism of *Saccharomyces kluyveri*: growth, metabolite production, and quantification of metabolic fluxes. **Biotechnol. Bioeng**. v. 77, p. 186 - 193, 2002.

MONTES DE OCA, R.; SALEM, A. Z. M.; KHOLIF, A. E.; MONROY, H.; PÉREZ, L. S.; ZAMORA, J. L.; GUTIÉREZ, A. **Yeast: Description and Structure**. In A. Z. M. Salem, A. E. Kholif, & A. K. Puniya (Eds.), *Yeast additive and animal production*. India: PubBioMed Central Research Publishing Service, p. 4-13, 2016

MONTET, D.; RAY, R. C. **Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2016. 413 p.

MYCOLOGY. **Clavispora lusitaniae**. 2016. Disponível em: <<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/clavispora/>> Acesso em: 28 nov. 2018.

NASCIMENTO, M. M. F. do. **Ecologia Molecular de Leveduras Negras**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NI, Y.; YU, H.; LIN, G.; XU, J. An ene reductase from *Clavispora lusitaniae* for asymmetric reduction of activated alkenes. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 56, p. 40-45, mar. 2014.

NING, C.; SU, E.; WEI, D. Characterization and identification of three novel aldo-keto reductases from *Lodderomyces elongisporus* for reducing ethyl 4-chloroacetoacetate. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 564, p. 219-228, dez. 2014.

OBINNA-ECHEM, P. C.; KURI, V.; BEAL, J. Evaluation of the microbial community, acidity and proximate composition of *akamu*, a fermented maize food. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 94, n. 2, p. 331-340, jul. 2013.

OLIVA, J.; GIRÓN, F.; CAYUELA, J. M.; MULERO, J.; ZAFRILLA, P.; CÁMARA, M. Á. Effect of fungicides on the yeast population during spontaneous fermentation in the vinification of monastrell grapes. **Lwt**, [s.l.], v. 131, p. 1-7, set. 2020.

OLIVEIRA, M. G. B.; MARQUES, R. B.; SANTANA, M. F.; SANTOS, A. B. D.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, F. R. C.; BADAUÊ-PASSOS JR, D.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. [s.l.], v. 111, n. 2, p. 120-125, ago. 2012.

OLIVEIRA, M.; BARRETO, A.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; GUIMARÃES, A. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. **Rev. GEINTEC**. v. 4, n. 4, p.1292-1298, 2014.

OLIVEIRA-FELIPE, L. DE; BICAS, J. L.; OLIVEIRA, A. M. DE; NEVES, B. P.; OLIVEIRA JUNIOR, E. N. DE; PASTORE, G. M.; PINTO, L.L.L. Isolamento e Seleção de Micro-organismos produtores de bioaromas. In: Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos e Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), 2015, **Resumos...**

OMELIANSKI, V. L. Aroma-Producing Microorganisms. **J Bacteriol**. v. 8, n. 4, p. 393-419, jul. 1923.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 80, n. 5, p. 290-296, jul. 2009.

PARK, Y. C.; SHAFFER, C. E. H.; BENNETT, G. N. Microbial formation of esters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 85, n. 1, p. 13-25, 28 ago. 2009.

PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; YANG, T. S.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of Fruity Aroma by Newly Isolated Yeast. **Biotechnology Letters**. Springer, v. 16, n. 4, n. 389, n. 392, 1994.

PEREZ, M. F.; CONTRERAS, L.; GARNICA, N. M.; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M. V.; FARÍAS, M. E.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J. R. Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 10, p. 1-13, out. 2016.

PIETROWSKI, G. A. M. **Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã**. 2011. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; OLIVEIRA, P.; COELHO, J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Activity of *Thymus caespititius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 62, p. 107-112, dez. 2014.

PRAGAS, C.B. **Biotecnologia** – Histórico. 2013. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=50#abrefecha>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

PYBUS, D.; SELL, C. The Chemistry of Fragrances. **Royal Society of Chemistry**, out. 2007. 294 p.

QIAN, X.; YANG, Q.; SOLAIRAJ, D.; LEGRAND, N. N. G.; SERWAH, B. N. A.; ZHANG, H. Population dynamics of *Rhodotorula mucilaginosa* on apples, apple

defense response, and transcriptomic response of the yeast to patulin. **Biological Control**, [s.l.], v. 146, p. 1-8, jul. 2020.

QUILTER, M. G.; HURLEY, J. C.; LYNCH, F. J.; MURPHY, M. G. The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.** v. 109, p. 34 - 40, 2003.

RAJPERT, L.; SKŁODOWSKA, A.; MATLAKOWSKA, R. Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. **Chemosphere**, [s.l.], v. 91, n. 9, p. 1257-1265, maio 2013.

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; USMAN, L. M.; SILVA-BEDOYA, L. M.; OSORIO-CADAVID, E. Dominant yeasts associated to mango (*Mangifera indica*) and rose apple (*Syzygium malaccense*) fruit pulps investigated by culture-based methods. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 91, n. 4, p. 1-13, jul. 2019.

RANJAN, K.; LONE, M. A.; SAHAY, S. Detergent Compatible Cold-Active Alkaline Amylases from *Clavispora Lusitaniae* CB13. **J Microbiol Biotech Food Sci**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 306-310, fev. 2016.

REBELLO, S.; ABRAHAM, A.; MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; BINOD, P.; BAHULEYAN, A. K.; ANEESH, E. M.; PANDEY, A. Non-conventional Yeast cell factories for sustainable bioprocesses. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], p.1-10, 13 set. 2018.

REISER, J.; OCHSNER, U. A.; KÄLIN, M.; GLUMOFF, V.; FIECHTER, A. *Trichosporon*. **Nonconventional Yeasts In Biotechnology**, [s.l.], p. 581-606, 1996.

RESENDE, L. V.; PINHEIRO, L. K.; MIGUEL, M. G. C. P.; RAMOS, C. L.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 1-11, mar. 2018.

RIEGE, P.; SCHUNCK, H. W.; HONECK, H.; MÜLLER, H. G. Cytochrome P-450 from *Lodderomyces elongisporus*: Its purification and some properties of the highly purified Pprotein. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 98, n. 2, p. 527 - 534, jan. 1981.

RODARTE, M. P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 147 p., 2008.

RODRIGUES DE MIRANDA, L. *Clavispora*, a new yeast genus of the *Saccharomycetales*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 45. p. 479 - 483, 1979.

RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. p. 101-121. In: Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. The Yeast Handbook. Berlin, Heidelberg: Springer. 2006.

ROMAN, H. Development of Yeast as an Experimental Organism. In: STRATHERN, J. N.; BROACH, E. W.; JONES, J. R. **Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. Cap. 1. p. 1-9.

ROTHER, M. **Introduction to aroma research**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. 148 p.

RUIZ, J.; ORTEGA, N.; MARTÍN-SANTAMARÍA, M.; ACEDO, A.; MARQUINA, D.; PASCUAL, O.; ROZÈS, N.; ZAMORA, F.; SANTOS, A.; BELDA, I. Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 305, p. 1-9, set. 2019.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA-FILHO, E. S.; MENDES, M. B.; SILVA-FILHO, J. C. da; PONTE, M. P. T. R.; MOURA, L. H. P.; OLIVEIRA, E. C. A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavor and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 28, n. 5., p. 333-339, ago 2013.

SANTOS, A. S. R. **Bioprospeção: considerações gerais**. 2000. Disponível em: <<https://jus.com.br/artigos/1859/bioprospecao-consideracoes-gerais>>. Acesso em: 19 dez. 2019

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.

SCHAAF, J.; WALTER, M. H.; HESS, D. Primary metabolism in plant defense. **Plant Physiol**, v. 108, p. 949-960, 1995.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. **Biotechnology Of Isoprenoids**, [s.l.], p. 19-61, 2014.

SCHNEITER, R. **Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast**. Fribourg: Université di. Fribourg Suisse: 2004. 86 p.

SELL, C. S. **A fragrant introduction to terpenoid chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. 432 p.

SHUKLA, O. P.; MOHOLAY, M. N.; BHATTACHARYYA, P. K. Microbiological transformations of terpenes. Part X. Fermentation of α -terpineol and β -pinenes by a soil pseudomonad (PL-strain). **Indian J. Biochem.** v. 5, p. 79-91, 1968.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, jun. 1995.

SILÓNIZ, M. I.; PAYO, E. M.; CALLEJO, M. A.; MARQUINA, D.; PEINADO, J. M. Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 210, n. 2, p. 233-237, mai. 2002.

SINGH, P.; SAHOTA, P. P.; SINGH, R. K. Evaluation and characterization of new α -L-rhamnosidase-producing yeast strains. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. 149-156, 2015.

SOKA, S.; IRENE, M. Molecular analysis of yeasts from Indonesian cassava and glutinous rice tapé. **Food Science And Biotechnology**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 993-997, ago. 2013.

SOLEIMANI, M.; SHEIKHOLESAMI, M. A.; GHAFGHAZI, S.; POURIRAN, R.; PARVARDEH, S. Analgesic effect of α -terpineol on neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rat sciatic nerve: Involvement of spinal microglial cells and inflammatory cytokines. **Iran J Basic Med Sci**, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 1445–1451, dez. 2019.

SOUSA, G. C.; BATISTA, C. A. C. A.; VIEIRA, F. S.; CUNHA, G. A.; SILVA, F. L. Ação antifúngica do α -terpineol sobre cepas de leveduras pertencentes ao gênero *Cândida*. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 8, n. 4, p. 967-973, 2016.

SOUZA, R. H. L.; CARDOSO, M. S. P.; MENEZES, C. T.; SILVA, J. P.; SOUSA, D. P.; BATISTA, J. S. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 277–281, ago. 2011.

SPENCER, J. F. T.; RAGOUT DE SPENCER, A. L.; LALUCE, C. Non-conventional yeasts. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 147-156, jan. 2002.

SREEKRISHNA, K.; KROPP, K. E. *Pichia pastoris*. **Nonconventional Yeasts In Biotechnology**, [s.l.], p.203-253, Berlin, Heidelberg: Springer, 1996.

SUSHILKUMAR, A. D.; YOGESH, P. T.; MOMIN, S. A.; INDRAKANT, V. B.; Biotechnological routes in flavour industries. **Advanced Biotech**, p. 20-31, mar. 2008.

TABACHNICK, J.; JOSLYN, M. A. Formation of esters by yeast. II. Investigations with cellular suspensions of *Hansenula anomala*. **Plant. Physiol.** v. 28, p. 681-692, 1953.

TACHIYARA, T.; HASHIMOTO, H.; ISHIZAKI, S.; KOMAI, T.; FUJITA, A.; ISHIKAWA, M.; KITAHARA, T. Microbial resolution of 2-methylbutyric acid and its application to several chiral flavour compounds. **Flavour Science - Recent Advances And Trends**, [s.l.], p. 97-100, 2006.

TADASA, K. Intermediates in the Bacterial Degradation Pathway of α -Terpineol. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s.l.], v. 41, n. 10, p. 2095-2096, mai.1977.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, 2009. 819 p.

TCHIMENE, M. K.; OKUNJI, C. O.; IWU, M. M.; KUETE, V. Monoterpenes and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. **Medicinal Plant Research In Africa**, [s.l.], p. 1-32, 2013.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

UTAMI, H.; BUDIMAN, A.; SUTIJAN; ROTO; SEDIWAN, W. B. Synthesis of α -Terpineol from Turpentine by Hydration in a Batch Reactor. In: **Proceedings 17th ASEAN Regional Symposium on Chemical Engineering**, Bangkok, Thailand, p. 22-23, nov. 2010.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S. de; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 61, p. 137-144, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 373 p.

WALLACE, S. **The benefits of synthetic biology**. (2017). Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/news/the-benefits-of-synthetic-biology/3007694.article#/>> Acesso em: 17 out. 2020.

WANG, L.; CHI, Z.; WANG, X. LIU, Z.; LI, J. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology**, [s.l.] v. 57, n. 4, p. 495-501, set. 2007

WANG, Q.; YE, T.; MA, Z.; CHEN, R.; XIE, T.; YIN, X. Characterization and site-directed mutation of a novel aldo-keto reductase from *Lodderomyces elongisporus* NRRL YB-4239 with high production rate of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 41, n. 11, p. 1609-1616, set. 2014.

WANG, X. C.; LI, A. H.; DIZY, M.; ULLAH, N.; SUN, W. X.; TAO, Y. S. Evaluation of aroma enhancement for "Ecolly" dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 228, p. 550-559, ago. 2017.

WANG, X.; QIN, L.; ZHOU, J.; LI, Y.; FAN, X. A novel design to screen chlorogenic acid-producing microbial strains from the environment. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-10, out. 2018.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E.; KATZ, I. Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 105-169, jan. 1989.

WENDAHOON, S. K.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y.; ISHIMARU, M. Effect of short-term anaerobic conditions on the production of volatiles, activity of alcohol acetyltransferase and other quality traits of ripened bananas. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 86, n. 10, p. 1475-1480, 2006.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes For Phylogenetics. **Pcr Protocols**, [s.l.], p. 315-322, 1990.

WILEY-VCH. **Ullmann's Food and Feed**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, v. 2, 2017. 1576 p.

WOLF, K. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**: a handbook. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 619 p.

YADAV, S.; SRIVASTAVA, A. K. Synthesis of Functional and Alternating Copolymer of α -Terpineol with Butylmethacrylate. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, [s.l.], v. 43. n. 4, p. 1229-1243, fev. 2007.

YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T.; AKITA, O.; HARA, S.; YOSHIZAWALS, K. Purification and Characterization of Acyl Coenzyme A: alcohol acyltransferase of neurospora. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 6, p. 1551-1556, jun. 1989.

YANG, J. J.; GUO, C. F.; GE, W. P.; WANG, Q. N.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; YANG, J.; MA, Y.; YUAN, Y. J.; QIN, L. H. Isolation and identification of yeast in yak milk dreg of Tibet in China. **Dairy Science & Technology**, [s.l.], v. 94, n. 5, p. 455-467, jun. 2014.

YOSHIOKA, K.; HASHIMOTO, N. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast. **Agric. Biol. Chem.** v. 45, p. 2183-2190, 1981.

YOU, L.; WANG, S.; ZHOU, R.; HU, X.; CHU, Y.; WANG, T. Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 122, n. 3, p. 517-523, jul. 2016.

ZHANG, C.; LI, M.; ZHAO, G. R.; LU, W. Alpha-Terpineol production from an engineered *Saccharomyces cerevisiae* cell factory. **Microb. Cell. Fact.** v. 18, n. 160, p. 1-9, 2019.