

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR LEVEDURAS DE MICROBIOTA DE FLORES

STÉFANY KEEL BRESSAN^{1,2}, MARIANA DA COSTA DINIZ^{1,2}, LARISSA WERLANG^{1,2}, CAMILA GIRARDI DE OLIVEIRA^{1,2}, TRICIANI TORNAI PEREIRA², ANDERSON GIEHL^{2,3}, ODINEI FOGOLARI¹, ANGELA ALVES DOS SANTOS², SÉRGIO LUIZ ALVES JR^{1,2,3,4}

1 Introdução

Leveduras são capazes de produzir metabólitos secundários como ácidos graxos e terpenos, sendo muitos deles compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Fenner *et al.*, 2022; Tadioto *et al.*, 2023). Assim como os demais compostos, os VOCs têm grande relevância biotecnológica. Eles podem ser produzidos por leveduras ao metabolizarem os açúcares presentes em nectários florais (Ryniewicz *et al.*, 2020). Entretanto, em estações sem floração, as leveduras buscam o trato gastrointestinal de insetos polinizadores como habitat por períodos prolongados, seja para segurança, reprodução ou transporte (Makopa *et al.*, 2024). Tanto nas flores quanto nos insetos, as leveduras são reconhecidas pela sua capacidade de fermentar os principais carboidratos disponíveis nesses ambientes (Kishigami *et al.*, 2023).

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de metabólitos secundários produzidos por leveduras isoladas de flores e insetos.

3 Metodologia

3.1 Isolamento, identificação e cultivo das leveduras

As leveduras utilizadas no presente trabalho estão apresentadas na Tabela 1. O isolamento e a identificação taxonômica dessas linhagens foram realizados conforme descrito por Tadioto *et al.* (2022). Todas as linhagens foram cultivadas em frascos com meios YP (10 g/L de extrato de leveduras e 20 g/L de peptona, pH 5,0) contendo, alternadamente, 20 g/L de xilose, frutose, glicose e celobiose ou 150 g/L de sacarose. Os cultivos foram realizados sob agitação de 145 rpm a 30 °C por 48 h em todas as condições, exceto para os meios com sacarose, que permaneceram incubados por 72 h (haja vista a maior disponibilidade de

¹ Graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, Campus Chapecó, email stefanybressan123@gmail.com

² Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Grupo de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (GPMA), Campus Chapecó, UFFS, Chapecó/SC.

³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, UFSC

⁴ Doutor em Ciências Biológicas, UFSC, Orientador

açúcar). Para o acompanhamento do crescimento celular, amostras do meio foram coletadas três vezes ao dia e suas absorbâncias foram analisadas em um espectrofotômetro (DO 570 nm).

Tabela 1 – Linhagens de levedura, identificação taxonômica e local de isolamento.

LINHAGEM	ESPÉCIE	LOCAL DE ISOLAMENTO
CHAP-209	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	
CHAP-210	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	
CHAP-213	<i>Aureobasidium</i> sp.	
CHAP-214	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	FLOR (<i>Senna macranthera</i>)
CHAP-216	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	
CHAP-218	<i>Meyerozyma</i> sp.	
CHAP-221	<i>Aureobasidium</i> sp.	
CHAP-223	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	BESOURO (<i>Astylus variegatus</i>)
CHAP-242	<i>Meyerozyma caribbica</i>	ABELHA (<i>Scaptotrigona postica</i>)
CHAP-245	<i>Meyerozyma caribbica</i>	ABELHA (<i>Tetragonisca angustula</i>)

3.2 Análise dos metabólitos secundários por GC-MS

Ao fim dos cultivos, todos os meios foram transferidos para tubos Falcon que passaram por uma centrifugação a 8500 g por 5 min e tiveram seus sobrenadantes reservados. Com o auxílio de um funil de separação, 20 mL de cada sobrenadante foram misturados a 6,67 mL de diclorometano para extração líquido-líquido, seguindo uma adaptação de Roque *et al.* (2019). Na sequência, a fase apolar contendo diclorometano foi enviada para um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), a fim de identificar os compostos provenientes do metabolismo das leveduras avaliadas. A biblioteca utilizada para a espectrometria foi a NIST08s, considerando-se apenas as moléculas com índices de similaridade (IS) $\geq 80\%$. A produção dos compostos foi analisada de forma semiquantitativa através das áreas de cada pico, o que representa a abundância relativa de cada composto em relação aos demais, conforme descrito por Di Francesco *et al.* (2015). Como controle negativo, meios de cultura prévios ao inóculo também passaram por extração e análise cromatográfica.

4 Resultados e Discussão

Todas as linhagens testadas apresentaram capacidade de crescimento nas fontes de carbono disponíveis (Figura 1). Entretanto, as cepas CHAP-242 e CHAP-245 tiveram um crescimento duas vezes superior quando comparado com as demais. Além disso as duas cepas apresentaram crescimentos mais acelerados nas horas iniciais dos cultivos.

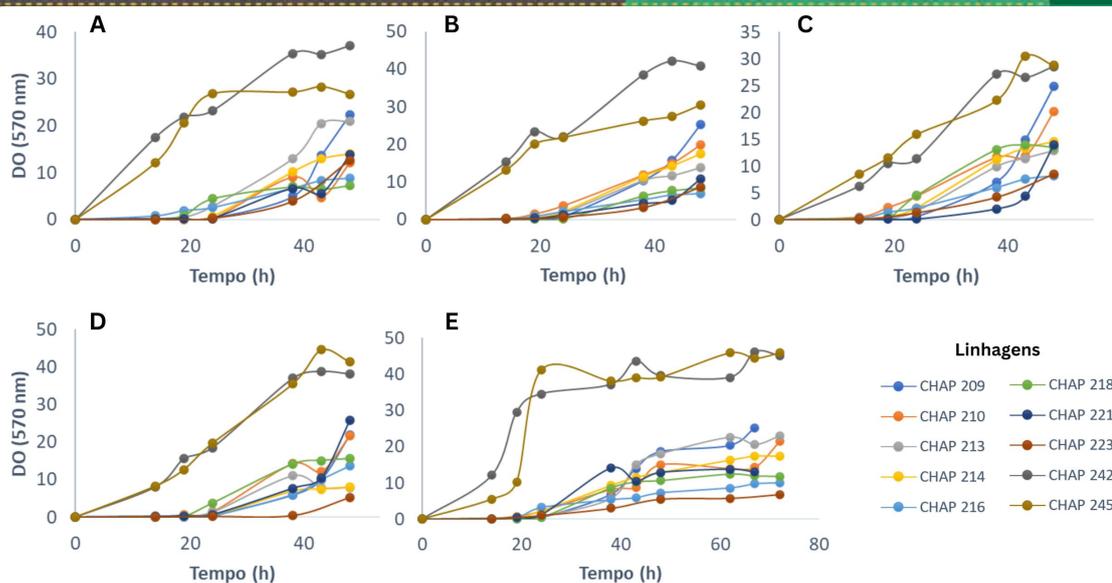


Figura 1 – Curvas de crescimento das leveduras em meios contendo glicose (A), frutose (B), xilose (C), celbiose (D) ou sacarose (E) como carboidratos disponíveis.

Durante os cultivos, as dez linhagens produziram nove compostos distintos, a partir das cinco fontes de açúcares disponíveis (Quadro 1). O eucaliptol, um terpenoide, foi produzido pela CHAP-223 em xilose. Os terpenos são produzidos pelas leveduras por meio da oxidação do piruvato, gerando Acetil-CoA, que por sua vez é destinado a via do mevalonato. Este terpeno possui propriedades bioativas e é amplamente utilizado na indústria farmacêutica (Zha *et al.*, 2021). O triptofol, também presente nas amostras, pode ser convertido por leveduras a ácido indol-3-acético, auxina vegetal que auxilia no crescimento das plantas (Petkova *et al.*, 2022).

A figura 2 apresenta uma análise semiquantitativa dos compostos obtidos ao fim de todos os cultivos, analisados em conjunto. A área de pico expressa a abundância relativa de cada composto (Di Francesco *et al.*, 2015). O 2-fenil-etanol aparece como o composto com maior destaque, haja vista sua produção em todas as fontes de carbono disponíveis. Além disso, todas as linhagens testadas foram capazes de produzir tal composto (quadro 1). O 2-fenil-etanol é um álcool superior, obtido por leveduras por meio do fenilpiruvato, metabólito utilizado na rota da biossíntese da fenilalanina. Quando não há adição de L-fenilalanina, esse composto é produzido pelas leveduras por meio via de Shiquimato (Serp; von Stockar; Marison, 2003). Ele pode ser utilizado como agente aromatizante, em pesticidas e como conservante (Fenner *et al.*, 2022).

Embora não tenha sido produzida em todas as condições e por todas as cepas, a

substância 4-Hidroxi-2-metilacetofenona, quando presente, se apresentou com elevadas áreas de pico, respondendo por 48,8% da concentração de compostos presentes ao fim do cultivo da CHAP-248 em sacarose. Tal substância é um composto fenólico com importantes propriedades antioxidantes, antitumorais, analgésicas e antissépticas (Dandekar *et al*, 2015; Martinez *et al.*, 2019) . Por fim, outros compostos como ácido esteárico, ácido fenilacético, ácido oleico, metionol e benzaldeído também foram produzidos, porém em pequenas quantidades.

Quadro 1 - Compostos produzidos pelas leveduras durante os cultivos com cinco açúcares diferentes.

GLICOSE		FRUTOSE		SACAROSE	
nº da linhagem	Composto	nº da linhagem	Composto	nº da linhagem	Composto
210, 214, 221, 242, 245	2-fenil-etanol	210, 213, 222, 237, 242, 245	2-fenil-etanol	209, 214, 221, 223, 242, 245	2-fenil-etanol
210	Metionol	214	Ácido Fenilacético	245	Metionol
214	4-Hidroxi-2-metilacetofenona	214	Ácido Estearico	213	4-Hidroxi-2-metilacetofenona
245	Triptofol	210	4-Hidroxi-2-metilacetofenona	210	Benzaldeído
223, 242, 245	Fosfato de Trietila	245	Triptofol	245	Metionol
		223, 242, 245	Fosfato de Trietila	221, 223, 242, 245	Fosfato de Trietila
CELOBIOSE		XILOSE			
nº da linhagem	Composto	nº da linhagem	Composto		
221, 223, 242, 245	2-fenil-etanol	210, 214, 242, 245	2-fenil-etanol		
214	Benzaldeído	209	4-Hidroxi-2-metilacetofenona		
223, 242, 245	Fosfato de Trietila	221, 223, 242, 245	Fosfato de Trietila		
242	Triptofol	223	Eucaliptol		
223	Eucaliptol				

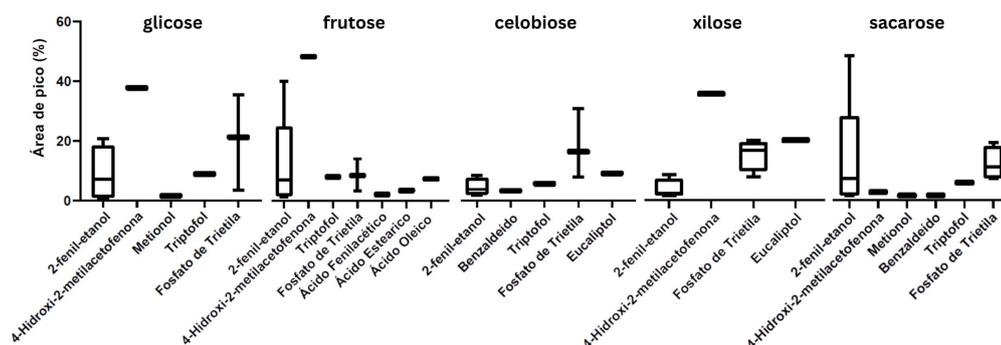


Figura 2 - Análise semiquantitativa dos metabólitos secundários produzidos pelas leveduras em meios contendo glicose, frutose, celobiose, xilose ou sacarose como fontes de carbono.

5 Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam o potencial biotecnológico de leveduras associadas a flores e insetos. Esses microrganismos demonstraram capacidade de produção de diversos

compostos, com destaque para o 2-fenil-etanol e a 4-Hidroxi-2-metilacetofenona. Haja vista a predominância desses compostos, vislumbra-se a possibilidade de produção em maior escala.

Referências Bibliográficas

- DANDEKAR R. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 1, 2015.
- DI FRANCESCO, Alessandra *et al.* Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v. 81, p. 8–14, 2015.
- FENNER, Eduardo D. *et al.* Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 984, 2022.
- KISHIGAMI, Mako *et al.* Yeast associated with flower longicorn beetle *Leptura ochraceofasciata* (Cerambycidae: Lepturinae), with implication for its function in symbiosis. **PLOS ONE**, v. 18, n. 3, p. e0282351, 2023.
- MAKOPA, Tawanda P. *et al.* Yeast–insect interactions in southern Africa: Tapping the diversity of yeasts for modern bioprocessing. **Yeast**, v. 41, n. 5, p. 330–348, 2024.
- MARTINEZ, Silvia Juliana *et al.* Effect of Bacterial and Yeast Starters on the Formation of Volatile and Organic Acid Compounds in Coffee Beans and Selection of Flavors Markers Precursors During Wet Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- PETKOVA, Mariana *et al.* Tobacco Plant Growth-Promoting and Antifungal Activities of Three Endophytic Yeast Strains. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 751, 2022.
- ROQUE, Laerti Reis *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775–787, 2019.
- RYNIEWICZ, Justyna *et al.* Intraspecific Variation in Nectar Chemistry and Its Implications for Insect Visitors: The Case of the Medicinal Plant, *Polemonium Caeruleum* L. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1297, 2020.
- SERP, D.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 1, p. 103–110, 2003.
- TADIOTO, Viviani *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 35, 2022.
- TADIOTO, Viviani *et al.* Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. **Fermentation**, v. 9, n. 4, p. 363, 2023.
- ZHA, Jian *et al.* Yeast-Based Biosynthesis of Natural Products From Xylose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

Palavras-chave: Abelha, Besouro, 2-fenil-etanol, VOCs, 4-Hidroxi-2-metilacetofenona

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2023-0352

Financiamento: UFFS.