

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM LEVEDURAS ASSOCIADAS A PLANTAS E INSETOS

TRICIANE TORNAI PEREIRA^{1,2,*}, VIVIANI TADIOTO^{2,3}, ANDERSON GIEHL^{2,3},
ODINEI FOGOLARI², IZABELLA T. DA SILVA³, GISLAINE FONGARO³, SÉRGIO L.
ALVES JR.^{2,3,**}

1 Introdução

As leveduras são os microrganismos mais utilizados para fins biotecnológicos. Embora tenham sido reconhecidas principalmente por sua aplicação nas indústrias de bebidas e bioetanol, esses microrganismos podem ser empregados eficientemente no setor farmacêutico (Alves Jr *et al.*, 2022). Na produção de medicamentos, as leveduras são altamente desejáveis por sua capacidade de produzir substâncias com atividade biológica (em especial, compostos fenólicos) a partir de substratos simples (Tadioto *et al.*, 2023a).

2 Objetivos

Analisar a presença de compostos bioativos em extratos de células de leveduras oriundas de diferentes microambientes.

3 Metodologia

3.1 Leveduras utilizadas e condições de cultivo

As linhagens de levedura utilizadas no presente trabalho foram previamente isoladas de lagartas (*Papiliotrema laurentii* CHAP-158 e *Meyerozyma caribbica* CHAP-204), flores (*Rhodotorula* sp. CHAP-208 e *Aureobasidium* sp. CHAP-221), abelhas (*Meyerozyma* sp. CHAP-243) e ambiente industrial (*Saccharomyces cerevisiae* PE-2) (Albarello *et al.*, 2023; Tadioto *et al.*, 2023b). As leveduras foram inicialmente pré-cultivadas em meio YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por 48 h, a 200 rpm e 30°C. Em seguida, as células do pré-cultivo foram inoculadas na proporção de 1/100 em YPD_X (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de xilose) e incubadas a 30°C e 200 rpm até uma densidade óptica de 20,0 a 570 nm. A separação das células do meio de cultura

¹ Curso de Graduação em Medicina, UFFS, *campus* Chapecó.

² Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Grupo de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (GPMA), UFFS, *campus* Chapecó.

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

* Bolsista de Iniciação Científica: tri_tornai@outlook.com

** Orientador: slalvesjr@uffs.edu.br

líquido foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. As células foram submetidas a dois ciclos de lavagem com água destilada autoclavada a 4°C. Em seguida, as biomassas celulares foram pesadas e congeladas a uma temperatura de -20°C, sem a adição de criopreservantes para favorecer a lise celular.

3.2 Produção de extratos com as células das leveduras

Foram realizadas extrações exaustivas com as biomassas celulares suspensas em 10 mL de metanol-água (80:20, v/v). Em um funil de separação, a suspensão celular foi misturada, alternadamente, com os solventes orgânicos hexano, acetato de etila e butanol na proporção de 1:1 (v/v). Cada solvente foi homogeneizado com a biomassa e mantida em repouso até que as fases da extração líquido-líquido fossem observadas e fosse possível a separação por escoamento. As amostras foram então filtradas com auxílio de um funil com algodão compactado. O refinado (fase aquosa) também foi utilizado como fracionado. As frações foram adicionadas em balões de fundo redondo, anexadas em rotaevaporador sob pressão reduzida e vaporizadas conforme o ponto de ebulição de cada solvente utilizado. Após a vaporização total dos solventes, as amostras foram congeladas em freezer e mantidas congeladas com auxílio de nitrogênio líquido para a liofilização até a secagem completa dos extratos.

3.3 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada em microplaca seguindo protocolo adaptado de Singleton; Rossi (1965). Para isso, os extratos foram suspensos em metanol na concentração de 1 mg/mL. Em cada poço da microplaca, foram adicionados 20 µL de amostra, 20 µL de solução Folin-Ciocalteu a 1 N, 20 µL de metanol P.A., 180 µL de água destilada e 60 µL de carbonato de sódio a 10% (m/v). A reação ocorreu protegida da luz durante 40 min a temperatura ambiente. Ao fim da incubação, as microplacas foram agitadas por 60 segundos, e as absorbâncias foram lidas a 760 nm. Uma curva padrão com seis concentrações de ácido gálico (variando de 0 a 10 µg/mL) foi construída, e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por massa de extrato (mg/g).

3.4 Determinação de compostos bioativos por HPLC

Os extratos obtidos foram também analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo LCMS-2020 (Shimadzu). As amostras liofilizadas foram solubilizadas em álcool metílico, em seguida filtradas em membranas de 0.45 µm de

porosidade e então transferidas para vials cromatográficos para injeção em uma coluna capilar Shim-pack GISS-C18 (4,6 mm x 150 mm x 3 μ m). Como fase móvel, foi utilizada uma solução 0,3% de ácido fórmico em 99,7% de metanol, com vazão de 0,4 mL/min. O detector utilizado foi o espectrômetro de massas. A curva padrão de cada composto foi calibrada utilizando cinco concentrações, variando de 1 a 10 mg/L. Os padrões utilizados foram a quercetina, miricetina, kaempferol, ácido cafeico, epicatequina, ácido p-cumárico, pirocatequina, ácido siríngico, flavona, ácido gálico e epigallocatequina.

4 Resultados e Discussão

A determinação de fenólicos totais demonstra que os diferentes solventes analisados possuem capacidades distintas de extração dessa classe de compostos. Ademais, o sucesso dos solventes variou também a depender da linhagem de levedura. Enquanto o hexano, por exemplo, promoveu a extração de expressiva concentração de fenólicos a partir da linhagem *M. caribbica* CHAP-204, com o acetato de etila nada foi detectado para essa levedura. Em contrapartida, este último proporcionou a detecção de fenólicos nos extratos das cepas *Rhodotorula* sp. CHAP-208 e *Meyerozyma* sp. CHAP-243, que nada apresentaram na extração com hexano (Figura 1).

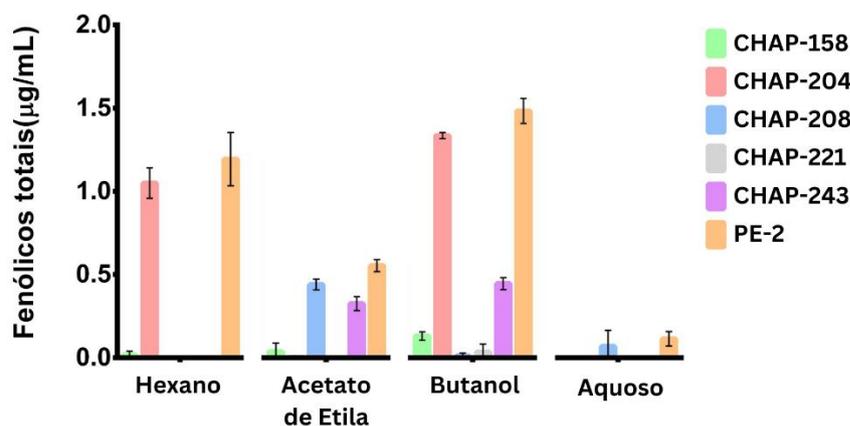


Figura 1. Determinação de compostos fenólicos totais em extratos de células das linhagens CHAP-158, CHAP-204, CHAP-208, CHAP-221, CHAP-243 e PE-2 nas frações com hexano, acetato de etila, butanol e na fase aquosa.

A linhagem *S. cerevisiae* PE-2 foi a única a apresentar compostos fenólicos em todos os extratos e no refinado (Figura 1). Cabe salientar que esta levedura é amplamente utilizada pela indústria de etanol combustível no Brasil. Portanto, a cada ano, toneladas dessas leveduras sobram como resíduos ao fim dos processos fermentativos. Estima-se que sejam

gerados 30 g de biomassa de levedura para cada litro de etanol produzido (Modesto *et al.*, 2021). Desse modo, existe um grande potencial de aproveitamento dessas células com propósitos mais nobres, haja vista seu conteúdo de compostos fenólicos.

Nas análises cromatográficas, o ácido p-cumárico foi o composto predominante em oito dos dezoito extratos celulares produzidos. Também neste caso, destaca-se a linhagem PE-2, haja vista que o maior teor desse composto fenólico foi encontrado no extrato dessa levedura em acetato de etila, com 1,037 mg de ácido p-cumárico em 50 mg de extrato (Tabela 1). O ácido p-cumárico é descrito como redutor de espécies reativas de oxigênio, e existem evidências de que esse composto contribua para o tratamento de processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças do sistema nervoso (Aldaba-Muruato *et al.*, 2021).

Tabela 1. Compostos fenólicos quantificados (em mg) ou detectados em 50 mg de extrato. ND: não determinado.

Extrato de leveduras	Compostos Bioativos										
	Quercetina	Miricetina	Kaempferol	Ácido caféico	Epicatequina	Ácido p-cumárico	Pirocatecol	Ácido siríngico	Flavona	Ácido gálico	Epigallocatequina
CHAP-158 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-158 Acet. de etila	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-158 Aquosa	ND	ND	ND	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Acet. de etila	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	0.156	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-204 Aquosa	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Acetato de etila	ND	ND	ND	ND	ND	0.188	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-208 Aquosa	Detectado	Detectado	Detectado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Butanol	ND	ND	ND	ND	Detectado	0.220	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Acet. de etila	ND	ND	ND	ND	ND	0.286	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-221 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.094
CHAP-243 Butanol	ND	ND	ND	ND	Detectado	0.066	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-243 Acet. de etila	ND	ND	ND	ND	Detectado	0.136	ND	ND	ND	ND	ND
CHAP-243 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado
PE-02 Butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PE-02 Acet. de etila	ND	ND	ND	ND	1.807	1.037	ND	ND	ND	ND	ND
PE-02 Aquosa	ND	ND	ND	ND	ND	0.110	ND	ND	ND	ND	ND

Cabe destacar também que as análises cromatográficas apontaram a presença de outros compostos com atividade biológica, como a quercetina, miricetina, kaempferol e epicatequina.

Com exceção deste último no extrato da PE-2 em acetato de etila (1,807 mg em 50 mg), os demais não puderam ser quantificados (foram apenas detectados pelo cromatógrafo), pois suas concentrações ficaram abaixo dos limites da curva padrão (Tabela 1). No entanto, os resultados aqui encontrados para a epicatequina são bastante promissores. Em outro estudo, conduzido com a levedura *Wickerhamomyces anomalus*, os autores quantificaram cerca de 2 µg/mg de epicatequina em suas amostras (Tonini *et al.*, 2024), enquanto o nosso fracionamento em acetato de etila com a PE-2 apresentou 36 µg/mg (1,807 mg/50 mg) desse composto.

5 Conclusão

Os resultados obtidos indicam que leveduras de diferentes origens podem ser cultivadas em substratos simples e produzir compostos com diferentes atividades biológicas. Ademais, extratos celulares com potencial bioativo podem ser obtidos de leveduras residuais encontradas no fim de processos fermentativos realizados em larga escala, como a produção de etanol.

Referências Bibliográficas

- ALBARELLO, M. L. R. *et al.* Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **BioEnergy Research**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 2046–2057, 2023.
- ALDABA-MURUATO, L. *et al.* Therapeutic perspectives of *p*-coumaric acid: Anti-necrotic, anti-cholestatic and anti-amoebic activities. **World Academy of Sciences Journal**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 47, 2021.
- ALVES JR, S. L. *et al.* Are Yeasts “Humanity’s Best Friends”? In: ALVES JR., S. *et al.* (org.). **Yeasts: From Nature to Bioprocesses**. [S. l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2022. p. 431–458.
- MODESTO, H. R. *et al.* Activated carbon production from industrial yeast residue to boost up circular bioeconomy. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 28, n. 19, p. 24694–24705, 2021.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- TADIOTO, V. *et al.* Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. **Fermentation**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 363, 2023a.
- TADIOTO, V. *et al.* Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 1133–1145, 2023b.
- TONINI, S. *et al.* Apple Blossom Agricultural Residues as a Sustainable Source of Bioactive Peptides through Microbial Fermentation Bioprocessing. **Antioxidants**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 837, 2024.

Palavras-chave: Ácido *p*-cumárico; Epicatequina; Fenólicos; *Saccharomyces cerevisiae*.
Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0350

Financiamento: UFFS.