

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Gabriel Silame Corte

Análise da hidrofobicidade celular e caracterização do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e análise dos parâmetros cinéticos de crescimento e produção

Uberlândia-MG

Abril-2022

Gabriel Silame Corte

Análise da hidrofobicidade celular e caracterização do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e análise dos parâmetros cinéticos de crescimento e produção

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Coorientador: Thamirys Gimenes Coutinho de Sousa

Uberlândia-MG

Abril-2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C827 Corte, Gabriel Silame, 1998-
2022 Análise da hidrofobicidade celular e análise dos
parâmetros cinéticos de crescimento e produção de
biossurfactantes pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*
[recurso eletrônico] / Gabriel Silame Corte. - 2022.

Orientador: Edgar Silveira Campos.
Coorientador: Thamirys Gimenes Coutinho.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em
Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. I. Campos, Edgar Silveira, 1981-,
(Orient.). II. Coutinho, Thamirys Gimenes, -,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Gabriel Silame Corte

Análise da hidrofobicidade celular e caracterização do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e análise dos parâmetros cinéticos de crescimento e produção

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia, 08 de abril de 2022

Banca Examinadora:

Edgar Silveira campos – IBTEC/UFU

Raquel Cristina Cavalcanti Dantas – IBTEC/UFU

Nathiele Contrera Gimenes – Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas obtidas através do metabolismo secundário de certos microrganismos, e em comparação com os surfactantes químicos utilizados atualmente, possuem baixa toxicidade, alta estabilidade em meios extremos (pH, temperatura e salinidade) e são biodegradáveis. O grande problema para a utilização dos biossurfactantes são seu alto custo de produção, que acaba gerando dificuldade na aplicação desta nas diversas áreas da indústria. Neste presente trabalho, utilizou-se resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas comusus*), como folhas e casca, como fonte de carbono com o objetivo de diminuir o custo de produção dessa biomolécula. A levedura utilizada para a produção do biossurfactante foi a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* de CRM 747, que foi isolada do ambiente antártico e que apresentou condições de crescimento e produção favoráveis neste trabalho. Os resultados de análise de crescimento, produção e hidrofobicidade celular mostraram que o pico máximo para a produção de biossurfactantes pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* se encontra no período de 16 horas de fermentação com suplementação com resíduo de abacaxi após 10 horas do início do experimento, em que a produtividade aumentou de 21,2 g.L⁻¹ para 36 g.L⁻¹. Em relação a hidrofobicidade celular, a levedura apresentou índices acima do 70% apenas em óleo de soja.

Palavras-chave: Fermentação, biossurfactante, análise de produtividade, hidrofobicidade.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules obtained through the secondary metabolism of certain microorganisms, and compared to chemical surfactants currently used, they have low toxicity, high stability in extreme environments (pH, temperature and salinity) and are biodegradable. The major problem for the use of biosurfactants is their high production cost, which ends up making it difficult to apply them in different areas of the industry. In this present work, agro-industrial residues of pineapple (*Ananas comusus*), such as leaves and bark, were used as a carbon source in order to reduce the production cost of this biomolecule. The yeast used for the production of the biosurfactant was the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747, which was isolated from the Antarctic environment and presented favorable growth and production conditions in this work. The results of analysis of cellular growth, production and hydrophobicity showed that the maximum peak for the production of biosurfactants by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* is found in the period of 16 hours of fermentation with supplementation with pineapple residue after 10 hours of the beginning of the experiment, in which productivity increased from 21.2 gL⁻¹ to 36 gL⁻¹. Regarding cellular hydrophobicity, the yeast showed rates above 70% only in soybean oil.

Keywords: Fermentation, biosurfactants, productivity analysis, hydrophobicity.

1	Sumário	
2	INTRODUÇÃO.....	12
3	OBJETIVOS GERAIS	16
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	MICRORGANISMOS	16
4.2	PRÉ-INÓCULO	16
4.3	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	17
4.4	INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO	17
4.5	RENDIMENTO	18
4.6	EXTRAÇÃO POR ACETONA FRIA	18
4.7	CURVA DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA E PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	19
4.8	HIDROFOBICIDADE CELULAR.....	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

2 INTRODUÇÃO

Surfactantes possuem propriedades que interessam diversas áreas da indústria e vem se colocando como alvos de estudos. Dentre essas propriedades estão a redução da tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis, capacidade de emulsificação e concentração micelar crítica (CMC). Essas características atribuídas aos surfactantes se devem ao fato deste ser uma molécula anfifílica, ou seja, possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofóbica (Saharan et al., 2011).

As moléculas com essas características e de utilização na indústria atualmente, são provindas de derivados de petróleo ou outras fontes óleo químicas, e devido a isto estas podem apresentar toxicidade e não são biodegradáveis (Marchant e Banat, 2012). Porém, existem ainda os surfactantes que são produzidos através de microrganismos, e para estes dá-se o nome de biosurfactante. Os biosurfactantes são biomoléculas que conferem à mistura praticamente todos os benefícios de um surfactante químico, mas por outro lado, possuem uma baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, e biocompatibilidade (Liu et al., 2011; Sanches et al., 2021).

A produção dos biosurfactantes são comumente produzidos através do processo de fermentação, que utilizam algumas fontes de carbono para a obtenção de energia e de metabólitos secundário (neste caso, o biosurfactante). Como uma tentativa de redução dos custos, surge a proposta de utilizar resíduos agroindustriais que apresentem uma excelente quantidade de lipídeos e carboidratos, e dentre esses, resíduos como o de soja, milho, coco e amendoim podem ser uma boa opção. (Barbieri et al., 2012; Meneses et al., 2017).

O aumento do interesse da indústria nos biosurfactantes alavancou as buscas por microrganismos capazes de produzir essas moléculas, intensificando assim a pesquisa de culturas microbianas de ecossistemas variados. Com isso, o bioma Antártico garantiu seu destaque por ser um local inóspito e por possuir uma vasta biodiversidade. Microrganismos como os fungos, bactérias e algas que habitam esse ecossistema merecem uma grande atenção pois são capazes de produzir algumas substâncias biologicamente ativas que não se encontram em outros locais (Buzzini et al., 2012; D'amico et al., 2006).

Apesar do interesse em ambientes extremos, ainda há poucos trabalhos relatando o estudo com microrganismos em ambientes frios, como o caso da Antártica. O estudo da microbiota da Antártica não é importante apenas em relação às aplicações biotecnológicas, mas também para a obtenção de novos dados e informações ecológicas e taxonômicas desse ambiente (Cabrera *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2014). Devido ao habitat extremo em que habitam, os microrganismos

extremófilos podem apresentar uma série de adaptações e características positivas que podem ser empregadas em processos industriais. Além dos estudos de substâncias ativas encontradas nesses organismos, surge também o interesse em seus metabólitos secundários, já que estes podem ser estratégias químicas para a competição por substrato ou até mesmo para defesa (Singh *et al.*, 2011; Bhadury *et al.*, 2006).

De acordo com Cai *et al.* (2014), os biossurfactantes que são provindos de microrganismos presentes em ambientes frios possuem baixa temperatura de Kraftt, que permite que estes sejam utilizados em diferentes temperaturas sem perder a sua atividade.

A Antártica é um ambiente que possui o clima mais seco do planeta Terra, em que mais de 99% do seu território é coberto por gelo durante longos períodos. A temperatura desse ambiente é baixa, porém existe uma alta variação entre ela (sendo possível chegar até 15°C no verão e -80°C no inverno), com ventos fortes, alta taxa de sublimação e evaporação, elevada incidência de radiação ultravioleta (UV), baixa disponibilidade de água no estado líquido, que irá influenciar na prosperidade de qualquer ser vivo. Porém, apesar de todos esses fatores adversos, a Antártica possui uma vasta diversidade biológica (Cabrera e Blamey, 2018; Margesin e Miteva, 2011; Rosa *et al.*, 2010; Ruisi *et al.*, 2007; Yergeau e Kowalchuk, 2008).

Alguns microrganismos possuem adaptações fisiológicas e metabólicas que os permitem habitar ambientes com situações adversas de crescimento, principalmente a baixa temperatura (Zucconi *et al.*, 2020). Os organismos capazes de sobreviver ao frio podem ser divididos em dois grupos, sendo eles os psicrófilos (grupo que engloba os incapazes de crescer em temperaturas acima de 20°C) e os facultativos (que crescem em temperaturas baixas, porém possuem uma taxa de crescimento elevadas quando cultivados em temperaturas acima dos 20°C) (Brunati *et al.*, 2009; Buzzini *et al.*, 2012).

Os microrganismos encontrados na Antártica apresentam diversas adaptações e não são capazes de regular sua temperatura interna, possuindo assim a mesma temperatura do meio externo. Dentre as adaptações presentes, temos: a presença de micélios estéreis, produção de melanina e produção de outros compostos como proteínas anticongelantes. Todas essas estratégias biológicas irão culminar para o mesmo objetivo, que é reduzir os resultados deletérios da formação de cristais de gelo e protegê-los contra um possível congelamento intracelular (Gilbert *et al.*, 2004; Kawahara, 2017; Margesin e Fell, 2008; Shivaji e Prakash, 2010; Zucconi *et al.*, 2020).

De acordo com Margesin e Miteva (2011), a chave para a sobrevivência desses organismos em ambientes extremamente frios é a capacidade que eles possuem para contornar os efeitos negativos ocasionados por ela, modificando-se funcionalmente e estruturalmente. O trabalho

que mostrou que na Antártica existiam leveduras capazes de produzir biossurfactantes que funcionam em diversas áreas industriais foi realizado por Kimura e Miota (1975), onde estes estudaram o efeito do biossurfactante produzido pela levedura *Pseudozyma antarctica* em hidratação de peles danificadas. Eles perceberam essa biomolécula conseguiu reverter os danos na pele, de forma dose dependente, portanto poderia ser utilizada na indústria de cosméticos, por exemplo. Outro trabalho elaborado por Gesheva *et al.* (2010) estudou um biossurfactante produzido pela levedura da Antártica *Rhodococcus fascians*, e neste foi observado que a tensão superficial água/ar foi reduzida para 27 mNm⁻¹, além de inibir o crescimento de *B. subtilis* ATCC6633 e apresentar atividade hemolítica.

Seres como os fungos possuem alta adaptabilidade em diversas condições, e em diversos biomas e locais, além disso, estão presentes na Terra há milhares de anos. Estes apresentam um papel fundamental trabalhando com decompositores de matéria orgânica (Zucconi *et al.*, 2020). Seres como as leveduras são unicelulares, com coloração branca ou avermelhada e tamanho variando entre 1 e 5 µm de diâmetro e 5 a 30 µm de comprimento. Possuem diferentes formatos, podendo ser esférica, elíptica e quase filamentosa.

Esses organismos possuem membrana citoplasmática lipoprotéica e parece celular rígida, onde a membrana é responsável pelas interações com o meio exterior. Ademais, são seres eucariotos (possuem uma membrana, chamada de carioteca, envolvendo o núcleo) e se reproduzem de maneira sexuada ou assexuada, sendo respectivamente por formação de esporos ou por brotamento, divisão binária e formação de artoconídeos. (Hoog *et al.*, 2000).

Uma série de trabalhos utilizando leveduras para a produção de biossurfactantes com diferentes objetivos estão descritos na literatura. Sharma *et al.* (2019) focaram na otimização da produção do biossurfactante produzido pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* YK32. Camargo *et al.* (2018) desenvolveram uma pesquisa para analisar a produção de biossurfactante por oito leveduras em condições de pH baixo utilizando óleo de soja residual como fonte de carbono. As oito leveduras utilizadas nesses experimentos foram: *meyerozyma guilliermondii* (accession number KX455858), *Candida orthopsilosis* (accession number KR136231), *Cryptococcus luteolus* (accession number KR136232), *Rhodotorula glutinis* (accession number KR136236), *Rhodotorula mucilaginosa* (accession number KR136233), *Hannaela sinesis* (accession number KR136235), *Dipodascus australiensis* (accession number KR136229) e *Metschnikowia koreensis* (accession number KR136230).

Mais voltado para o setor alimentício, Ribeiro *et al.* (2020) avaliaram a possibilidade de utilizar o biossurfactante produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 para substituir a gema de ovo em biscoitos. Porém, a maioria dos trabalhos com leveduras

producentes de biossurfactante focam na utilização de *Candidas*, porém, as espécies pertencentes a este gênero são classificadas como patógenos oportunista e devido a isso não possuem GRAS (*generally regarded as safed*), parâmetro que indica se um microrganismo possui ou não toxicidade e patogenicidade e suas possíveis aplicações e de seus produtos nos setores industriais (Carneiro *et al.*, 2019).

Devido a este ponto contrário dos organismos do gênero *Candidas*, outros produtores de biossurfactante tem sido estudado por vários autores, e leveduras do gênero *Rhodotorula* tem ganhado destaque muito pelo fato de sua alta taxa de crescimento em matéria-prima barata (Branco *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Wirth e Goldani, 2012). A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* pertence ao filo Basidiomycota, sendo um fungo saprofítico. As culturas de desses seres necessitam de 24 a 48 horas de incubação para serem possíveis de detectar visualmente, apresentando uma coloração amarelada/avermelhada e um aspecto de colônia que é liso e/ou mucoso (Hoog *et al.*, 2000; Kwon-Chung e Bennet, 1992). De acordo com Fell *et al.* A *Rhodotorula* não é capaz de fermentar carboidratos e possuem uma temperatura ótima de crescimento em torno de 25°C a 37°C.

Dentre o gênero *Rhodotorula*, apenas a *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula minuta* possuem patogenicidade para os seres humanos, porém além da primeira de ser classificada como um patógeno oportunista ela possui aplicações biotecnológicas interessantes. (Gan *et al.*, 2107).

Estudos realizados utilizando leveduras do tipo *Rhodotorula glutinis* mostraram que esta em querosene e óleo cru (80%) apresentou uma produção de biossurfactante e níveis significativos de emulsificação, além de que a o produto apresentou taxas de 76% de remoção de óleo bruto de alguns poluentes. (Olok e Glick, 2005).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* podem ser encontradas e isoladas de diversos ambientes, sendo estes o solo, água, ar, poeira e alguns substratos que são comumente encontrados em ambientes humanos, porém houve um aumento pela busca de fungos e leveduras que se localizam em locais com condições pouco favoráveis, como por exemplo: profundezas do mar, a Antártica, ambiente aquáticos hipersalinos e de alta temperatura e diversos outros. (Pavlova *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a hidrofobicidade celular do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e analisar os parâmetros cinéticos para o crescimento da levedura e para a produção do biossurfactante.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a hidrofobicidade celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 em diferentes hidrocarbonetos;
- Avaliar a curva de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 e produção do biossurfactante;
- Avaliar a produção da biomolécula pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747 ao longo de 24 e 30 horas de fermentação, com e sem suplementação de fonte de carbono;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Taxonomicamente identificada por Duarte *et al.* (2013), a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, que possui código de isolamento L69, foi coletada a partir de algas marinhas localizadas em Plunta Plaza (Admiralty Bay, Ilha King George, Antártica) e utilizada nesse presente estudo. A levedura encontra-se depositada no Centro de Recursos Microbianos (CRM – UNESP) da Universidade Federal de São Paulo (UNESP, Brasil) com o número de acesso de CRM 747, sendo conservada pelo método de criopreservação com 50% (v/v) de glicerol.

4.2 PRÉ-INÓCULO

Para o procedimento de adaptação e crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa*, foi incubado 1 mL do criotubo (contendo glicerol e microrganismo) em 100 mL de YPD (g.L-1): glicose (10), peptona (5) e extrato de levedura (3) durante 72 horas a 15°C e sob agitação de 150 rpm.

4.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais utilizados por esse presente trabalho foram basicamente as cascas e as folhas do abacaxi (*Ananas comusus*), que após serem coletado em mercados e restaurantes locais, foram lavados com hipoclorito de sódio 10% (v/v) e processados em laboratório. A quantificação de açúcares totais foi realizada através da metodologia descrita por Miller (1959), em que inicialmente faz-se uma hidrólise ácida com HCL 2N (v/v), com as amostras ficando um período de 5 minutos em banho maria e em seguida em banho de gelo, adicionando 2N de NaOH na sequência. Realiza-se a diluição das amostras e as adicionou-se em tubos tipo *folin wu*, 0,5 mL de amostra junto com 1 mL de reagente de DNS, repetindo-se o processo de 5 minutos em banho maria e banho de gelo posteriormente. Adicionou-se água destilada até completar a marcação de 12.5 dos tubos *folin wu*, realizou-se a homogeneização e em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados de absorvância que foram obtidos foram utilizados na equação $y=3570,5x$ (obtida através da plotagem dos resultados da curva padrão com coeficiente de correção linear (R^2) =0.9973) para a transformação em g.L⁻¹. As análises de resultados foram feitas em triplicatas e com 3 leituras para cada repetição, gerando um número final de nove resultados.

4.4 INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO

A análise da influência da fonte de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactantes, um pré-inóculo com densidade óptica (DO) a 600 nm foi colocado em um Erlenmeyer de 200 mL juntamente com 150 mL de YPD modificado. Feito isso, substituiu-se a glicose por fontes alternativas em quantidades suficientes (com o objetivo de atingir uma concentração final de 10 g.L⁻¹ de açúcares redutores), e para a avaliação das fontes de nitrogênio, foi realizada uma substituição de peptona e o extrato de levedura a uma concentração de 2 g.L⁻¹. O índice de emulsificação e a tensão superficial foram utilizados como indicativos para avaliar a produção de biossurfactantes pela levedura nas diversas fontes testadas. A Tabela 1 mostra as fontes de carbono testadas enquanto a Tabela 2 indica as fontes de nitrogênio utilizadas.

Tabela 1: fontes de carbono

Fonte de nitrogênio (2 g.L ⁻¹)	Fonte de carbono (10 g.L ⁻¹)	Solução Salina
Nitrato de Amônio	Acetato de sódio	10 g.L ⁻¹ de NaCl 5 g.L ⁻¹ de NaHPO ₄
	Citrato de sódio	
	Glicose	
	Sacarose	

Peptona	2 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄
Extrato de levedura	0.2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O
Extrato de abacaxi	
Extrato do caju	

*fermentação submersa: 56 horas a 120 rpm e 15°C

Tabela 2: fontes de nitrogênio

Fonte de carbono (10 g.L ⁻¹)	Fonte de nitrogênio (2 g.L ⁻¹)	Solução Salina
Sacarose	Citrato de amônio	
	Nitrato de amônio	10 g.L ⁻¹ de NaCl
	Sulfato de amônio	5 g.L ⁻¹ de NaHPO ₄
	Peptona	2 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄
	Extrato de levedura	0.2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O

*fermentação submersa: 56 horas a 120 rpm e 15°C

4.5 RENDIMENTO

A extração do biossurfactantes foi realizada seguindo a metodologia de Silva *et al.* (2010) usando como solvente do processo uma mistura de clorofórmio e metanol. Após a centrifugação do caldo fermentado por 20 minutos a 8.000 G (para separação e remoção das células), foi realizada a extração por acetona fria (item 4.6).

4.6 EXTRAÇÃO POR ACETONA FRIA

De acordo com a metodologia descrita por Ilori e Amund (2001), a amostra foi adicionado acetona fria na proporção de 1:3 (v/v) e esta foi incubada durante 10 horas a 4°C. A acetona fria fez com que o biossurfactantes precipitasse e após o término das 10 horas, este foi ressuspenso com água destilada. Após isso, a água foi evaporada em estufa de circulação forçada a 37°C e o rendimento do biossurfactante foi obtido por método gravimétrico.

4.7 CURVA DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA E PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Para encontrar a curva de crescimento e de produção de biossurfactantes em meio otimizado, uma densidade óptica (DO) a 600 nm do pré-inóculo foi colocada em um Erlenmeyer de 200 mL juntamente com 150 mL do meio otimizado (g.L⁻¹): extrato de abacaxi (25), extrato de levedura (15), peptona (1.5), sulfato de amônio (1); em solução salina (g.L⁻¹): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0.2).

Os Erlenmeyers contendo as amostras foram incubados (com ou sem suplementação de fonte de carbono após 10 e 20 horas de fermentação) a 15°C e 120 rpm durante 24 e 30 horas. A suplementação dos testes foi realizada com extrato de abacaxi e com a finalidade de atingir uma concentração final de 25 g.L⁻¹ de glicose.

Amostras foram retiradas em períodos de duas horas, durante o processo de fermentação, para determinar a concentração de biomassa, a produção do biossurfactante e o consumo dos açúcares redutores presentes no meio otimizado, e medido a densidade óptica a 600 nm para mensurar o crescimento das leveduras.

4.8 HIDROFOBICIDADE CELULAR

A hidrofobicidade celular foi avaliada segundo os métodos descritos por Lin *et al.* (2005), em que as células sofreram uma lavagem dupla com água destilada e depois foram ressuspendidas com tampão PUM (g.L⁻¹): K₂HPO₄.3H₂O (22.2), KH₂PO₄ (7.26), ureia (1.8), MgSO₄.7H₂O (0,2), com uma densidade óptica (DO) de 600 nm de 1 e volume final igual a 2 mL. A essas células foram adicionados diferentes hidrocarbonetos (querosene, óleo mineral e óleo de soja) em diferentes volumes, e a mistura foi incubada por 10 minutos a 30°C. Feito isso, foi realizado uma agitação da mistura por 2 minutos em vórtex, permanecendo em repouso por mais 10 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente retirada e medida sua absorbância a 600 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e codificada por L69 foi exposta e cultivada em diferentes condições de meio de cultura, uma série de fontes de carbono e nitrogênio foram testadas. Para a fermentação e produção do biossurfactante, utilizou-se temperatura de 15°C e 56 hr e os melhores meios foram selecionados utilizando os parâmetros de tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral.

Aboused *et al.* (2008) realizaram um estudo sobre a influência das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e na produção de biossurfactantes utilizando a bactéria *Pseudomonas*

fluorescens realizando os testes de índice de emulsificação em gasolina e analisando a tensão superficial verificar e comparar o desempenho desta bactéria. Eles obtiveram o melhor resultado utilizando óleo de oliva.

Cai *et al* (2014)., assim como Abouseoud *et al.*, também analisou a influência das fontes de carbono e nitrogênio ao caracterizar os biossurfactantes produzidos por diferentes linhagens de microrganismos. Eles concluíram que a diminuição da tensão superficial e a capacidade emulsionante de um biossurfactante não estão necessariamente correlacionadas.

Para a obtenção da curva de crescimento, foram realizados experimentos de 24 e 30 horas com e sem suplementação de fontes de carbono, e foram testados a dosagem de açúcares redutores totais. Biomassa (através da densidade óptica) e o rendimento da produção de biossurfactante pelo método de extração utilizando acetona fria como solvente. Os resultados estão apresentados nas figuras 1,2 e 3.

No início do experimento, a concentração de açúcares redutores totais era de 25 g.L^{-1} , sendo correspondente ao resíduo de abacaxi presente no meio de cultura, e o as condições da fermentação eram de 15°C e rotação de 120 rpm, sendo coletados dados em períodos de duas horas.

1

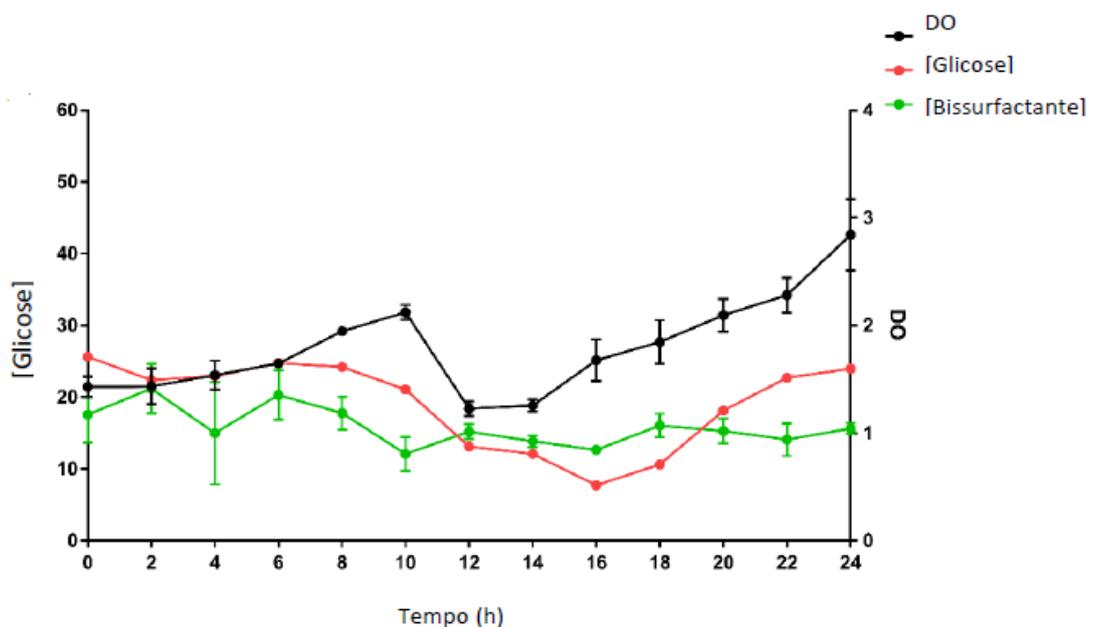


Figura 1: Curva de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e produção do biossurfactante durante o período de 24 horas de fermentação.

O gráfico apresentado acima mostra a curva de crescimento durante 24 horas de fermentação sem suplementação de fonte de carbono para o crescimento da levedura e produção

de metabólitos secundários. É possível observar que a quantidade inicial de glicose disponível foi suficiente por 10 horas de fermentação. Após isso, foi possível notar uma queda da densidade óptica, que possivelmente indica morte celular. A produção de biossurfactante foi acelerada no começo da fermentação, atingindo $21,2 \text{ g.L}^{-1}$ e em seguida, em um período após 6 e 10 horas, a produção sofreu queda. Com 10 horas de experimento, o rendimento seguiu praticamente estável até o final da série de fermentação.

Foi possível identificar que após se passarem 12 horas, a densidade óptica cresce novamente e permaneceu em declive até o final do experimento. Ademais, após 16 horas, foi notado o aumento na concentração de glicose, sendo possível afirmar, com a elevação dos dois parâmetros, que o biossurfactante pode ser utilizado como função de reserva energética para a levedura.

Para analisar a influência da suplementação de fonte de carbono, passando-se 10 horas, adicionou-se extrato de abacaxi com o objetivo de restaurar a concentração inicial de glicose (25 g.L^{-1}). Os dados obtidos são encontrados na figura abaixo.

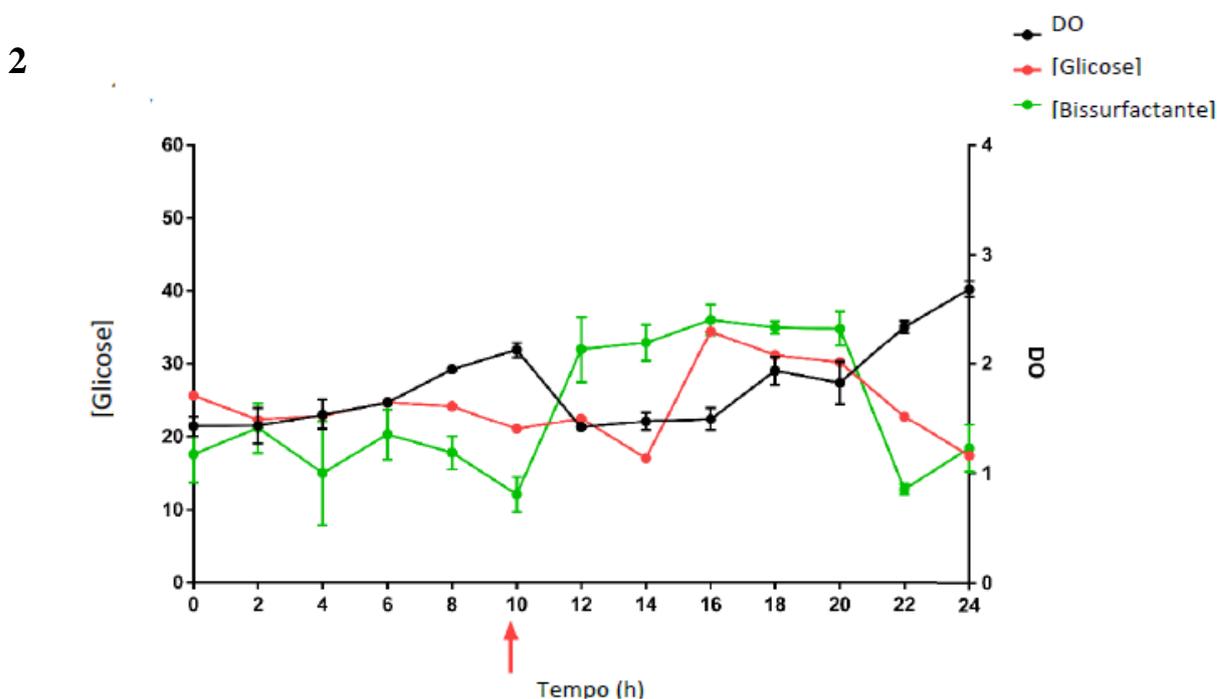


Figura 2: Curva que indica o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e a produção do biossurfactante durante o período de 24 horas e com suplementação após 10 horas do início do experimento.

É possível notar que após a suplementação, o rendimento da produção de biossurfactantes atingiu seu ápice após 16 horas (36 g.L^{-1}), com 22 horas sua concentração começa a ter queda e com 22 horas de fermentação atingiu $12,8 \text{ g.L}^{-1}$. Ao final do período de 24 horas, a concentração encontrada de biossurfactantes era de $18,4 \text{ g.L}^{-1}$.

Notou-se que a concentração de glicose sofreu queda após as 16 horas e que a densidade óptica abaixou das 10 às 12 horas, porém após esse intervalo foi percebido uma crescente até o final do experimento.

Devido a isso, confirmou-se que com a suplementação de glicose houve uma melhora no rendimento (saindo de $21,2 \text{ g.L}^{-1}$ e chegando a 36 g.L^{-1}). Reforçando a hipótese de que o biossurfactante pode servir como reserva energética, o decréscimo da concentração da biomolécula e da concentração de glicose no meio foi acompanhada do aumento na densidade óptica.

O segundo momento do experimento foi desenhado utilizando uma suplementação do meio com extrato de abacaxi após 10 e 20 horas de fermentação. A quantidade adicionada em cada tempo teve objetivo de restaurar a concentração de glicose para 25 g.L^{-1} . Os resultados estão evidenciados na Figura 16

3

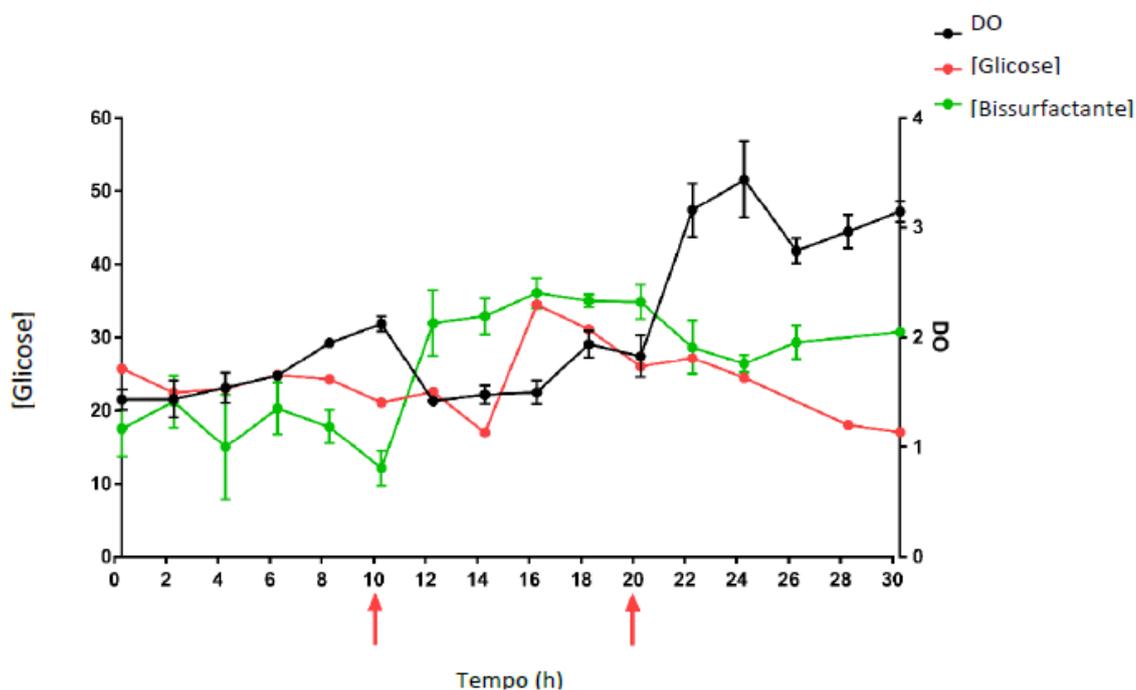


Figura 3: Representação da curva de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 e da produção de biossurfactante durante o período de 30 horas com suplementação após 10 e 20 horas do início do experimento.

De acordo com a Figura 3, ficou evidente que a suplementação com extrato de abacaxi após 20 horas de experimento não resultou num aumento da produção de biossurfactante, influenciando apenas o crescimento celular, visto pela crescente da densidade óptica. Devido a isso, apenas a suplementação após 10 horas de fermentação foi necessária. Fica claro também que apenas uma fermentação de 16 horas é suficiente para atingir a maior produtividade do

biossurfactante, pois ao se decorrer 20 horas de experimento, a concentração deste metabólito entrou em queda no meio.

Assim como neste trabalho, He *et al.* (2017) analisou e comparou o rendimento e a produção de biossurfactante utilizando três formas de fermentação, sendo elas batelada, batelada alimentada e batelada alimentada sequencial e de acordo com os resultados, eles obtiveram, respectivamente, as concentrações de 57,5 g.L⁻¹, 74,9g.L⁻¹ e 151,2 g.L⁻¹. O maior rendimento foi de 84% para a batelada alimentada sequencial e o menor de 42,7% para a batelada alimentada. A batelada tradicional possuiu rendimento de 53,2%. Esses resultados indicam que para atingir a maior produtividade ao longo do processo é necessário realizar a alimentação com meio fresco e a diluição do caldo de cultura na batelada alimentada sequencial.

Para a análise da hidrofobicidade celular, foi realizada avaliações em três hidrocarbonetos distintos, sendo eles: querosene, óleo mineral e óleo de soja. Segundo com o descrito na literatura, células muito hidrofóbicas possuem taxas maiores de 60% enquanto as pouco hidrofóbicas possuem esse indicador menor que 10%.

De acordo com os estudos dirigidos por Mehdi *et al.* (2008), que correlacionou hidrofobicidade celular de cepas bacterianas com a capacidade de produção de biossurfactantes delas, mostrou que bactérias que possuíam maior hidrofobicidade celular produziam mais biossurfactante e devido a isso possuía uma maior degradação de petróleo bruto.

Na figura 4 é possível concluir que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou baixa hidrofobicidade celular em querosene e em óleo mineral (taxas abaixo dos 15%) possuindo alta hidrofobicidade celular (com taxas acima de 70%) apenas nas três concentrações testadas de óleo de soja (0,4 ; 0,8 e 1,2).

De acordo com Vasileva-Tonkova e Gesheva (2005), a hidrofobicidade pode afetar a adesão celular , podendo ser um fator importante para o microrganismo se aderir a superfície. Os biossurfactantes produzidos pela maioria das bactérias melhoram o contato da fase oleosa com o microrganismo. Esse aumento de contato pode ser obtido pela emulsificação e/ou solubilização do substrato no meio, ou pelo aumento da hidrofobicidade celular.

4

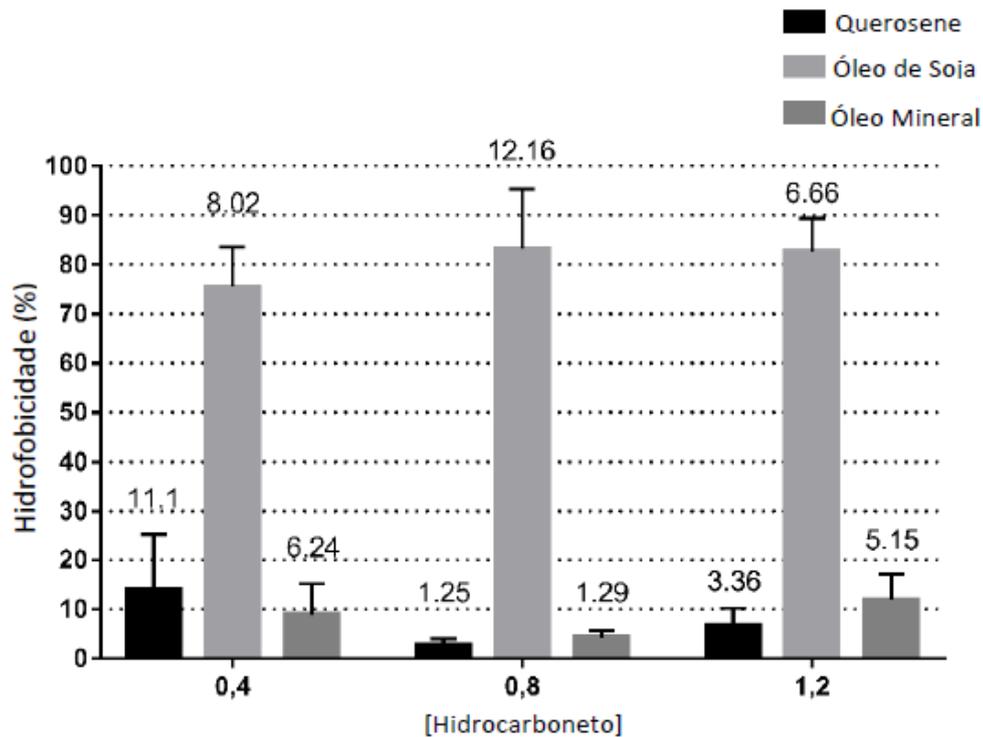


Figura 4: Valores de hidrofobicidade celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 747 em querosene, óleo de soja e óleo mineral; **valores sobrescritos:** desvio padrão (SD).

Hua *et al.* (2003) realizaram um experimento utilizando a levedura *Candida antarctica* em querosene a fim de avaliar a hidrofobicidade celular. Neste trabalho eles encontraram diferentes taxas de hidrofobicidade (%) para os meios com as seguintes fontes de carbono: n-undecano (52), n-hexadecano (47), óleo de soja (43) e glicose (18), mostrando que os componentes presentes no meio de cultura influenciam na hidrofobicidade celular.

Em 2005, Lin *et al.* escreveram sobre a análise da hidrofobicidade as superfícies celulares de seis linhagens bacterianas isoladas de ambientes contaminados por petróleo em Taiwan. Os experimentos foram feitos utilizando diesel e querosene em volumes de 0 a 0,2 mL. A *G. alkanivorans* CC-JG39 apresentou hidrofobicidade em diesel e querosene de 85% e 93% respectivamente, sendo a única linhagem a possuir hidrofobicidade celular maior que 60%. Ademais, além do teste de hidrofobicidade, eles realizaram teste de flutuação com as seis linhagens, e encontraram uma relação de que uma maior hidrofobicidade celular garante uma facilidade de flutuação.

6 CONCLUSÃO

Após os resultados expostos e discutidos acima, fica evidente que uma suplementação com fonte de glicose (extrato de abacaxi) após 10 horas do início da fermentação resultou no pico

de produtividade de biossurfactantes pela levedura, saindo de 21,2 g.L⁻¹ e chegando a 36 g.L⁻¹. Fica claro também que uma fermentação de apenas 16 horas é suficiente para atingir o pico produtivo de biossurfactante

Em relação a hidrofobicidade celular, podemos concluir que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou uma alta hidrofobicidade celular apenas nas três concentrações de óleo de soja.

Portanto, faz-se necessário a continuação dos estudos voltados a análise de crescimento da levedura e produção do biossurfactante e de outros microrganismos capazes de produzir tal biomolécula. Ademais, fica evidente a importância da continuação dos estudos, visto a capacidade de alta produtividade de biossurfactante e um enorme potencial biotecnológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, [S. l.], v. 223, n. 1–3, p. 143–151, 2008. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.198.
- BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G. F.; SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A. M.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 62–67, 2012. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.09.009.
- BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 325–337, 2006. DOI: 10.1007/s10295-005-0070-3.
- BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, T. M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por. *In*: ANAIS DO XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA., XVIII, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais [...]**. Foz do Iguaçu p. 6926–6934.
- BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine Genomics**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 43–50, 2009. DOI: 10.1016/j.margen.2009.04.002.
- BUZZINI, P.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; TURCHETTI, B. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 217–241, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x.
- CABRERA, M. Á.; BLAMEY, J. M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biological Research**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 37, 2018. DOI: 10.1186/s40659-018-0186-3.
- CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T. Screening of biosurfactant 80 producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 86, n. 1–2, p. 402–410, 2014. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.06.039.
- CAMARGO, F. P.; DE MENEZES, A. J.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 365, n. 10, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny098.
- CARNEIRO, C. V. G. C.; E SILVA, F. C. P.; ALMEIDA, J. R. M. Xylitol production: Identification and comparison of new producing yeasts. **Microorganisms**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7110484.

COELHO, A. R.; NOBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 32, n. Suplp, p. 1879–1892, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1879.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J. C.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. **EMBO Reports**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 385–389, 2006. DOI: 10.1038/sj.embor.7400662.

GAN, H. M.; THOMAS, B. N.; CAVANAUGH, N. T.; MORALES, G. H.; MAYERS, A. N.; SAVKA, M. A.; HUDSON, A. O. Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): Insights into *Rhodotorula phylogeny*, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. **PeerJ**, [S. l.], v. 2017, n. 11, 2017. DOI: 10.7717/peerj.4030.

GESHEVA, V.; STACKEBRANDT, E.; VASILEVA-TONKOVA, E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, antarctica. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 112–117, 2010. DOI: 10.1007/s00284-010-9584-7.

GILBERT, J. A.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R.; LAYBOURN-PARRY, J. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. **Microbiology**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 171–180, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.26610-0.

HE, N.; WU, T.; JIANG, J.; LONG, X.; SHAO, B.; MENG, Q. Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 157, p. 317–324, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.007.

HOOG, G. S. De; GUARRO, J. ; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, [S. l.], v. 37, n. 17, p. 4143–4150, 2003. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00380-4.

ILORI, M. O.; AMUND, D. I. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 56, n. 7–8, p. 547–552, 2001. DOI: 10.1515/znc-2001-7-812.

KAWAHARA, H. Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins. In: **Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 237–257. DOI: 10.1007/978-3-319-57057-0_11.

KIMURA, A.; MORITA, M. Fermentative production of CDP-choline. VII. Fermentative formation of CDP-choline by intact cells of a yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* (IFO 0641) treated with a detergent, triton X-100. **Agricultural and Biological Chemistry**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1469–1474, 1975. DOI: 10.1271/bbb1961.39.1469.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Infections due to *Trichosporon* and miscellaneous fungi. In: **Medical Mycology**. 2^o ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1992. p. 866.

LIN, T. C.; YOUNG, C. C.; HO, M. J.; YEH, M. S.; CHOU, C. L.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 466–472, 2005. DOI: 10.1263/jbb.99.466.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.003.

MARGESIN, R.; FELL, J. W. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 2977–2982, 2008. DOI:10.1099/ijs.0.2008/000836-0.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 162, n. 3, p. 346–361, 2011. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.12.004.

MENESES, D. P.; GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 204, p. 40–47, 2017. DOI:10.1016/j.micres.2017.07.004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MEHDI, Hasanshahian; GITI, Emtiazi. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 170–178, 2008.

OLOKE, J. K.; GLICK, B. R. Production of bioemulsifier by an unusual isolate of salmon/red melanin containing *Rhodotorula glutinis*. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 164–171, 2005. DOI: 10.5897/AJB2005.000-3033.

PAVLOVA, K.; RUSINOVA-VIDEVA, S.; KUNCHEVA, M.; KRATCHANOVA, M.; GOICHEVA, M.; DIMITROVA, S. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 163, n. 8, p. 1038–1052, 2011. DOI: 10.1007/s12010-010-9107-9.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in**

Bioengineering and Biotechnology, [*S. l.*], v. 8, n. May, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00434.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010. DOI: 10.1007/s11274-010-0324-8.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007. DOI: 10.1007/s11157-006-9107-y.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation, Applications , Current. [*S. l.*], v. 2011, p. 1–42, 2011.

SANCHES, M. A.; LUZEIRO, I. G.; CORTEZ, A. C. A.; DE SOUZA, E. S.; ALBUQUERQUE, P. M.; CHOPRA, H. K.; DE SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. **International Journal of Microbiology**, [*S. l.*], v. 2021, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1155/2021/6669263.

SHARMA, P.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. **Environmental Monitoring and Assessment**, [*S. l.*], v. 191, n. 9, 2019. DOI: 10.1007/s10661-019-7665-z.

SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? **Archives of Microbiology**, [*S. l.*], v. 192, n. 2, p. 85–95, 2010. DOI: 10.1007/s00203-009-0539-y.

SINGH, N. S.; SHAO, N.; MCLEAN, J. R.; SEVUGAN, M.; REN, L.; CHEW, T. G.; BIMBO, A.; SHARMA, E.; TANG, X.; GOULD, K. L.; BALASUBRAMANIAN, M. K. SIN-inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. **Current Biology**, [*S. l.*], v. 21, n. 23, p. 1968–1978, 2011. DOI: 10.1016/j.cub.2011.10.051.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Glycolipids produced by Antarctic *Nocardioides* sp. during growth on n-paraffin. **Process Biochemistry**, [*S. l.*], v. 40, n. 7, p. 2387–2391, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.09.018.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 2012, p. 1–7, 2012. DOI: 10.1155/2012/465717.

YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. **Environmental Microbiology**, [*S. l.*], v. 10, n. 9, p. 2223–2235, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01644.x.

ZUCCONI, L.; CANINI, F.; TEMPORITI, M. E.; TOSI, S. Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. **International**

Journal of Environmental Research and Public Health, [S. l.], v. 17, n. 18, p. 1–31, 2020.
DOI: 10.3390/ijerph17186459.

