

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Natália Manuela Strohmayer Lourencetti

“Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol”

Araraquara

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

“Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol”

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientando: Natália Manuela Strohmayer Lourencetti

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Enguita

Araraquara

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

LB92i Lourencetti, Natália Manuela Strohmayr
Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol / Natália Manuela Strohmayr Lourencetti. -- Araraquara, 2018.
158 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Francisco Javier Enguita.

1. *Candida tropicalis*. 2. miRNAs. 3. Fermentação Alcólica. 4. XenomiRs. 5. Bioetanol.
I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Enguita, Francisco Javier, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

NATÁLIA MANUELA STROHMAYER LOURENCETTI

Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: alvos inovadores para descontaminação na produção de bioetanol

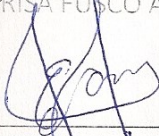
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 04 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA



ANA MARISA FUSCO ALMEIDA



ELOISA APARECIDA MOCHEUTI KRONKA



DANIEL GUARIZ PINHEIRO



ELEINI GOMES



TAIS MARIA BAUAB

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq – (processo nº 870026/2002-0).

A mulher mais guerreira, mais bonita e mais amável desse mundo, minha MÃE... Que há muitos anos não está mais entre nós e não pode ver nosso crescimento e o legado que por tão pouco tempo deixou guardado em nossos corações e em nossa mente, nos ensinando principalmente o que é respeito, dignidade, educação, humildade e sabedoria. Sei que de onde a senhora estiver, estará vendo mais esta etapa cumprida na minha vida, assim como a realização de um sonho, sei também que estará comigo sempre e que não importa as situações e dificuldades sua garra sempre estará comigo. Este trabalho e esse sonho são pra senhora, por nunca me deixar desistir mesmo de longe e sempre acreditar que podemos ser melhores. Com muito orgulho dedico este trabalho a minha MÃE (Emília in memoriam)

Te amo muito!

Agradeço...

A Deus, obrigada Pai por mais esta etapa e mais uma realização de um sonho realizado em minha vida, primeiramente agradeço ao Senhor por tudo, por todas as vezes que orei baixinho pedindo a força e paciência, pelos agradecimentos a cada graça recebida e por não desistir e estar comigo sempre. Que seu Espírito Santo esteja comigo sempre, e que as pedras no caminho, sejam obstáculos de aprendizado e vitória. Guia-me e guardai-me sempre.

"Você diz: "Isso é impossível", Deus diz: "Tudo é possível" (Lucas 18:27); Você diz: "Não vou conseguir", Deus diz: "Eu suprirei todas as suas necessidades" (Filipenses 4:19); Você diz: "Estou com medo", Deus diz: "Eu não te dei um espírito de medo" (II. Timóteo 1:7); Você diz: "Eu não posso fazer", Deus diz: "Você pode fazer tudo" (Filipenses 4:13); Você diz: "Não tenho condições", Deus diz: "Minha graça é suficiente" (II. Coríntios 12:9); Você diz: "Não vale a pena", Deus diz: "Tudo vale a pena" (Romanos 8:28)"

A minha família, que sem ela hoje não seria nada, a base da minha vida, minha alegria, minha paz. A meu avô o homem mais guerreiro que conheci que é muito mais que um avô, é um pai, um super-herói, sempre me mostrando o melhor caminho e o que é ser digno, pessoa de muitos valores que com certeza neste trabalho tem um pedacinho de cada um deles, que me ele me ensina todos os dias, com seu jeito único. A minha tia que é mais que uma tia, uma mãe, sem ela não seria capaz de ter tanta força pra passar pelos obstáculos, uma companheira, uma amiga que me escuta reclamar, chorar, gritar a frente dos obstáculos, e rir e comemorar comigo a cada etapa cumprida neste trabalho, sempre me mostrando o lado bom de cada situação e me acalmando. A minha irmã, meu cunhado e meu sobrinho Felipe.

As minhas segundas famílias que ganhei de presente de Deus, família Meneguel, minha irmã de coração Mari Meneguel, mãe, pai e João. Família Mendes que hoje está em São Paulo, Salete, Sofia, Helena (minha afilhada) e Telmo. Que ambas sempre estavam com um sorriso no rosto, quando aparecia triste com as dificuldades, sempre me escutando e me mostrando que tudo é uma fase e faz parte as dificuldades, mas que a vitória sempre vem e que eu era capaz. Nunca deixaram de acreditar em mim, sempre me colocando alegria e sorriso no rosto. Companheiros fiéis, famílias que Deus deu a mim de presente, obrigada por fazerem parte da minha vida e ajudarem a concretizar cada etapa desse trabalho.

"Casa e uma construção de cimento e tijolos, Lar e uma construção de valores e princípios e a maneira mais linda que Deus usa para te fazer feliz e dando-lhe uma Família!"

A minha amiga mais fiel Mari Galeani, uma irmã, uma companheira de trabalho, um espelho, que sempre que precisei estava presente para me ajudar sempre, mesmo que com um simples abraço, uma palavra de força, uma verdade. Com quem dividi as dificuldades e as alegrias desse trabalho e da vida. Amiga que levo para sempre comigo e que tenho certeza que estará até o fim comigo seja o caminho que for seguir me dando forças e comemorando sempre comigo.

A minha orientadora, Ana Marisa profissional competente e pessoa amiga, que a convivência me ensinou a admirar e respeitar. Agradeço pelo constante estímulo e confiança, por oferecer as melhores condições para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade constituída no decorrer destes anos. Muito obrigada!

À professora Maria José, por acreditar em meu potencial e permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa e por ser um exemplo de profissional, além de ser humano excepcional.

À Micologia – Proteômica que por mais difícil que o dia estivesse, tinha sempre alguém para te tirar um sorriso, dar uma força e compartilhar os obstáculos. Amigos que conquistei durante a minha caminhada: Rosângela, Rosemira, Junya, Fer Gullo, Nayla, Cláudia, Laranja, Lili, Haroldo, Panta, Priscila, Carol T., Suelen, Carol MG, Marina, Rodrigo, Jaqueline, Kayla, Mônica, Paulo e Vanessa. Saibam que cada um de vocês me ensinou uma coisa boa, e com certeza não só no meu trabalho, mas na vida vocês serão sempre um pedacinho do meu amadurecimento. Contem comigo sempre.

“Abençoados os que possuem amigo, os que têm sem pedir, porque amigo não se pedi, não se compra, não se vende, amigo a gente ganha!” – Machado de Assis

Ao professor Francisco Enquita (Paco) meu co-orientador que estive sempre dispostos a ajudar e colaborar para a conclusão deste trabalho.

A CNPq pelo apoio financiamento.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Acredito que ninguém consegue nada sozinho e que sempre existem em nossas vidas pessoas especiais e passantes que não menos importantes, nos ajudam a trilhar nossos caminhos. E cabe a nós agradecermos e quando possível e necessário ajudar, assim como fomos ajudados.

Muito obrigada!!!

“O único Sucesso que vale a pena, é aquele que nos dá o direito de no final do dia deitar a cabeça no travesseiro e você dormir feliz, sabendo que você foi o ser humano que você poderia ter sido” Pe. Fábio de Mello.

RESUMO

O processo de fermentação é amplamente utilizado em usinas brasileiras para produção de bioetanol e, mesmo sendo um processo amplamente difundido, a problemática sobre contaminações por micro-organismos ainda é uma incógnita. Problemas de redução de produtividade estão diretamente ligados à competição de nutrientes quando há decorrentes crises de contaminações por bactérias e leveduras não-*Saccharomyces*. Entre as leveduras contaminantes mais encontradas estão as pertencentes aos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Komagataella* e *Schizosaccharomyces*. Muitos antimicrobianos são utilizados para combater contaminações, porém com baixas especificidade e eficiência para leveduras contaminantes. O desenvolvimento de novas alternativas para a descontaminação do processo fermentativo e a busca por biomoléculas naturais e não geradoras de resíduos tóxicos, são emergenciais. Tais biomoléculas podem ser originárias dos miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA não codificantes que afetam a estabilidade dos RNAs mensageiros, atuando na expressão de transcritos dentro de processos biológicos, afetando controles transcricionais e pós-transcricionais, resultando na inibição ou potencialização da ação gênica nos processos biológicos fermentativos. Dessa forma, miRNAs livres na dorna de fermentação podem interferir de maneira controlada os contaminantes que competem com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de bioetanol. Em estudos anteriores de nosso grupo foi selecionada e estudada uma linhagem contaminante de *Candida tropicalis*, isolada de usina da região de Araraquara/SP, que perseverou durante o período de uma safra. Assim, como continuidade, nosso estudo visou elucidar o comportamento metabólico e transcricional do contaminante relevante, *C. tropicalis*, durante ciclo de fermentação, através de técnicas de capacidade fermentativa, sequenciamento do RNA global e identificar genes alvos para o desenvolvimento de miRNAs como biomoléculas antifúngicas pela triagem de miRNAs específicos da cana de açúcar em amostras do contaminante *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* (PE-2) e do caldo de cana (células da planta). Posteriormente, analisar *in silico* a presença destes genes/alvos identificados em outras espécies de leveduras contaminantes. Para tanto foram realizados estudos de capacitação fermentativa como testes de viabilidade celular (*Live/Dead*), atividade metabólica (XTT), estudos de assimilação de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e produção de etanol por HPLC do contaminante *C. tropicalis* com a levedura *S. cerevisiae* (PE-2) para verificar o comportamento competitivo desse contaminante. Assim, os resultados mostraram que a viabilidade do contaminante foi maior que da levedura PE-2 (94% e 81%, respectivamente), em um período de 8 horas de fermentação. A atividade metabólica e assimilação dos açúcares foram equivalentes, mas, para produção de bioetanol foi observado que ambas as linhagens produziram bioetanol ao final de 8 horas, porém, a contaminante de forma significativamente reduzida. Para estudar o comportamento transcricional da contaminante frente à fermentação alcoólica foi realizado sequenciamento de RNA global (*RNAseq-MiSeq*) e os resultados mostraram um número de genes significativamente expressos, tanto reprimidos quanto induzidos relacionados ao processo de fermentação, como transporte de açúcares, piruvato descarboxilase, metabolismo de aminoácidos, membrana, resistência e também processos ligados à transcrição, evidenciando que a levedura contaminante utiliza toda uma maquinaria de vias fermentativas, para produzir bioetanol. Para o desenvolvimento das biomoléculas antifúngicas foram realizados testes de RT-PCR, através de uma triagem de 25 miRNAs de cana de açúcar, frente a amostras de RNA total do contaminante *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e do caldo de cana, retiradas durante a fermentação de 8 horas, afim de elucidar interações importantes no processo fermentativo. Os resultados mostraram 11 miRNAs significativamente expressos, confirmando que interações genéticas através de miRNAs podem ocorrer entre espécies de reinos diferentes. Sendo assim, suas funções foram caracterizadas *in silico* e por esses resultados, foi realizada a busca de genes/alvos pelo *software* RNA22. Os dados analisados mostraram que 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 e sof-miR156) interagiram com 6 genes/alvo (CTRG_00017, CTRG_06114, CTRG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 e CTRG_03746). Duas interações específicas para *C. tropicalis* foram identificadas por dois miRNAs (sof-miR159a e sof-miR156) com três genes/alvos (CTRG_06114, 0416 e 03746). Assim, os seis genes/alvos identificados *in silico* exibiram por meio do programa *Blast* alta homologia para *C. tropicalis* e para diferentes gêneros de leveduras contaminantes não-*Saccharomyces*. Essa interação foi com aproximadamente 36 diferentes espécies de leveduras potenciais contaminantes de diversos ecossistemas. E por fim, os quatro miRNAs identificados não mostraram interação *in silico* com os genes de *S. cerevisiae*, portanto poderiam ser utilizados como biomoléculas antifúngicas potenciais para o controle da contaminação de dornas de fermentação para a produção de bioetanol.

Palavras chave: *Candida tropicalis*; miRNAs; Fermentação Alcoólica; XenomiRs; Bioetanol

ABSTRACT

The fermentation process is widely used in Brazilian plants for the production of bioethanol and, even though it is a widely diffused process, the problem of contamination by microorganisms is still unknown. Productivity reduction problems are directly linked to nutrient competition when there are bouts of contamination by bacteria and non-*Saccharomyces* yeasts. Among the most common contaminating yeasts are those belonging to the genera *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Komagataella* and *Schizosaccharomyces*. Many antimicrobials are used to combat contamination, but with low specificity and efficiency for contaminating yeasts. The development of new alternatives for the decontamination of the fermentative process and the search for natural biomolecules and non-toxic wastes are emergency. Such biomolecules may originate from the miRNAs, which are small molecules of non-coding RNA that affect the stability of messenger RNAs, acting on the expression of transcripts within biological processes, affecting transcriptional and post-transcriptional controls, resulting in the inhibition or potentiation of the gene action fermentative biological processes. Thus, free miRNAs in the fermentation dorna can interfere in a controlled manner the contaminants that compete with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the production of bioethanol. In previous studies of our group, a contaminant strain of *Candida tropicalis*, isolated from a plant in the region of Araraquara/SP, was selected and studied, which persevered during the period of one harvest. As a continuity, our study aimed to elucidate the metabolic and transcriptional behavior of the relevant contaminant, *C. tropicalis*, during the fermentation cycle, through fermentative capacity techniques, sequencing of global RNA and to identify target genes for the development of miRNAs as antifungal biomolecules by the screening of sugarcane-specific miRNAs in samples of contaminant *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* (PE-2) and broth of cane (plant cells). Subsequently, in silico analysis the presence of these genes / targets identified in other species of contaminating yeasts. For this purpose, fermentation training studies were performed, as well as cell viability tests (Live / Dead), metabolic activity (XTT), sugar assimilation studies (sucrose, glucose and fructose) and ethanol production by HPLC of *C. tropicalis* contaminant yeast *S. cerevisiae* (PE-2) to verify the competitive behavior of this contaminant. Thus, the results showed that the viability of the contaminant was higher than that of the PE-2 yeast (94% and 81%, respectively), in a period of 8 hours of fermentation. The metabolic activity and assimilation of sugars were equivalent, but for bioethanol production it was observed that both strains produced bioethanol at the end of 8 hours, but the contaminant significantly reduced. To study the transcriptional behavior of the contaminant against alcoholic fermentation, RNA sequencing (RNAseq-MiSeq) was performed and the results showed a number of significantly expressed genes, both repressed and induced related to the fermentation process, such as sugar transport, pyruvate decarboxylase, amino acid metabolism, membrane, resistance and also processes related to transcription, evidencing that the yeast contaminant uses a whole machinery of fermentation routes, to produce bioethanol. For the development of the antifungal biomolecules, RT-PCR tests were performed, through a screening of 25 sugarcane miRNAs, against samples of total RNA from the contaminant *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* and cane juice, collected during the fermentation of 8 hours, in order to elucidate important interactions in the fermentation. The results showed 11 significantly expressed miRNAs, confirming that genetic interactions through miRNAs can occur between species of different kingdoms. Therefore, its functions were characterized in silico and by these results, the search of genes / targets by the software RNA22 was performed. The analyzed data showed that 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 and sof-miR156) interacted with 6 genes/target (CTRG_00017, CTRG_06114, CTRG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 and CTRG_03746). Two interactions specific for *C. tropicalis* were identified by two miRNAs (sof-miR 159a and sof-miR156) with three genes / targets (CTRG_06114, 0416 and 03746). Thus, the six genes / targets identified in silico exhibited through the Blast program high homology to *C. tropicalis* and to different genera of non-*Saccharomyces* contaminating yeasts. This interaction was with approximately 36 different species of potential yeast contaminants from several ecosystems. Finally, the four identified miRNAs showed no in silico interaction with the *S. cerevisiae* genes, so they could be used as potential antifungal biomolecules for the control of contamination of fermentation dams for the production of bioethanol.

Keys words: *Candida tropicalis*; miRNAs; Alcoholic Fermentation; XenomiRs; Bioethanol

LISTA DE ABREVIATURAS

- %: Porcentagem
- +: Simbologia Numérica de Positivo
- ≥: Símbolo de Maior ou Igual
- ®: Simbologia de Marca Registrada
- °C: Graus Celsius
- µL: microlitro
- 3': Região da Extremidade Inicial da Fita de RNA
- 5': Região da Extremidade Final da Fita de RNA
- AGO: Família de Proteínas Argonautas
- atm: Simbologia de Pressão Relativa
- C4: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*
- C0: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*, amostra 0 hora
- C8: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*, amostra 8 horas
- CC: Identificação da Amostra de Cana de Açúcar
- CD-CUTs: Cytoplasmically Degraded Cryptic Unstable Transcripts
- cDNA: DNA complementar na síntese do RNA mensageiro
- céls/mL: Células por mililitro
- CRYSP: Clustered interpaced regularmente repetições palindrômicas curtas
- ct: Limiar do Ciclo de PCR
- CUTs: Cryptic Unstable Transcripts
- DCL1: Dicer-like – Proteína Nuclear
- DEPC: Reagente Dietil Pirocarbonato
- DGCR8: *Di George Syndrome Critical Region 8 Protein*
- DICER: Enzima Nuclease III
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- DROSHA: Enzima Ribonuclease III
- dsRNA: RNA Fita Dupla
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Exp5: Proteína Exportina 5
- g/L: Gramas por litro
- g: Gramas
- h: Hora
- H₂O: Símbolo Químico da Água
- HASTY: Proteína Transportadora
- HEN1: Hua Enhancer 1 – Enzima de Metilação
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
- HYL1: Hiponastic Leave 1 – Proteína Nuclear
- kpb: Peso Molecular
- P0: Identificação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amostra 0 hora
- P8: Identificação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amostra 8 horas
- lcrRNAs: RNA não Coficantes Longos
- miRBase: Banco de Dados de miRNAs
- miRNA: microRNA

- mL: mililitro
- mM: micro Molaridade
- mRNA: RNA mensageiro
- MUTs: Meiotic Unannotated Transcripts
- ncRNAs: RNAs não codificantes
- ng/μL: nanogramas por microlitro
- nm: Comprimento de onda- nanômetro
- PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato
- piRNAs: PIWI – interativas RNAs
- PIWI: Família De Proteínas De Interação Gênica
- Pol III: Enzima Polimerase III
- pre-miRNA: pré- microRNA
- pri-miRNA: Transcritos Primários na Biogênese dos miRNAs
- pta: *Pinus taeda*
- RIN: Número da Integridade do RNA
- RISC: Complexo Citoplasmático Composto pelo RCL + AGO
- RLC: Complexo de Ligamento de pre-miRNAs
- RNA: Ácido Ribonucléico
- RNA-seq: Sequenciamento de RNA
- rpm: Rotação por Minuto
- RPMI: Meio Tamponado de MOPS + Glicose
- rRNA: RNA ribossomal
- RT-PCR: Reação da Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase
- SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
- SERRATA: Proteína Nuclear
- siRNAs: small – intefering RNAs
- sof: *Saccharum officinarum*
- ssp: *Saccharum ssp*
- ssRNA: RNA Fita Simples
- SUTs: Stable Unannotable Transcripts
- TAE: Tampão de EDTA + Acetato de Sódio
- TERRAs: Telomeric Repeat Association Cryptic ncRNAs
- UniSp3 IPC: Calibrador da placa de RT-PCR
- UniSp6: Primer Controle Endógeno
- v: Voltagem
- x: Simbologia de multiplicação
- XTT: Ensaio Colorimétrico composto de Sal de Tetrazólio
- XUTs: xrn-1- sensitive Unstable Transcripts
- Y-12632: Identificação Taxonômica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*
- YEPD: Meio de Cultura composto de extrato de levedura, peptona A e dextrose
- β: Identificação da letra Grega Beta
- Δ: Símbolo da letra Grega Delta
- °Brix: Escala Numérica de Índice de Refração

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da produção e percentual de produção por continente: Américas: América do Sul - Brasil 43% (cana); América do Norte: EUA 44% (milho) e Canadá 2%; Europa 3% (legumes e trigo); África 1% e Oceania 1%.....	3
Figura 2: Esquema simplificado do funcionamento de uma usina sucroalcooleira no processo batelada, com umas suas principais fases para produção de açúcar e bioetanol.....	5
Figura 3: Representação esquemática das metodologias utilizadas em nosso estudo e suas Ciências.....	24
Figura 4: Representação esquemática da retirada das amostras (em tempo) das duas linhagens PE-2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) e C4 (<i>Candida tropicalis</i>) no ensaio de fermentação alcoólica.....	27
Figura 5: Esquema de distribuição dos miRNAs da cana de açúcar nas placas comerciais (<i>Pick-&-mix micromna pcr panel, 96 well ready-to-use (mi), vii7, Exiqon, Vedbaek, Dinamarca</i>) para o Screening, RT-PCR e análise dos miRNAs.....	36
Figura 6: Ensaio de Viabilidade Celular – <i>Live/Dead®</i>	39
Figura 7: Imagens da Viabilidade Celular – <i>In Cell Analyser</i> , objetiva de 20x.....	40
Figura 8: Concentração da atividade metabólica das linhagens de leveduras <i>Candida tropicalis</i> (C4) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2) pelo ensaio de XTT.....	42
Figura 9: Cinética de assimilação de sacarose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas.....	43
Figura 10: Cinética de assimilação de glicose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas.....	43
Figura 11: Cinética de assimilação de frutose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas.....	44
Figura 12: Cinética de produção de etanol, em quantificações por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas.....	45
Figura 13: Eletroferograma das amostras mostrando qualitativamente e quantitativamente a Integridade de RNA.....	48
Figura 14: <i>Heatmap</i> dos 30 principais genes diferencialmente expressos.....	50
Figura 15: Quantificação do processo biológico de genes diferencialmente expressos induzidos e reprimidos.....	51
Figura 16: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4)	60
Figura 17: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	61
Figura 18: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras agrupadas do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) quanto da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	62
Figura 19: Rede de interação dos possíveis alvos de miRNAs diferencialmente expressos nas amostras C0, C8, P0 e P8 com genes diferencialmente expressos nos sequenciamento (RNA-Seq) do contaminante <i>C. tropicalis</i>	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais antimicrobianos, tipo e mecanismo de atuação destes compostos utilizados nas usinas sucroalcooleiras....	13
Tabela 2: Quantificações e purezas das extração de RNA das amostras do caldo de cana de açúcar (CC), contaminante <i>C. tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0 e 8 horas (C0 e C8) e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2), nos tempos de 0h, 4h e 8h (P0 e P8).....	47
Tabela 3: Quantificação e dos top 100 genes selecionados para reprimidos e induzidos e suas classificações funcionais referentes ao processo de fermentação alcóolica das amostras C0 / C0 e C8 / C8 com valor de fold change > 2 e < -2, bem como p-valor de < 0,01.....	49
Tabela 4: Identificação nominal, espécie e sequência gênica dos 25 miRNAs de cana de açúcar selecionados para os ensaios de RT-PCR.....	56
Tabela 5: miRNAs diferencialmente expressos, com valores de fold change normalizados e em log ² de todas as condições individualmente analisadas das amostras do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4): CC-C0, CC-C8 e amostras das levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2): CC-P0, CC-P8. Análises das amostras agrupadas, contaminante <i>C. tropicalis</i> (C4): C0-C8 e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2): P0-P8.....	58
Tabela 6: Funções dos miRNAs diferencialmente expressos no RT-PCR nas amostras C0, C8, P0 e P8, para as condições individuais CC-C0, CC-C8, CC-P0 e CC-P8 obtidas pelo software <i>psRNA Target: A Plant Small.RNA Target Analysis</i>	63
Tabela 7: Identificação dos possíveis alvos de miRNAs e seu gene alvo de interação, obtidos pelo software RNA22, através da análise de expressão do RT-PCR para os miRNAs e sequenciamento de RNA (RNA-seq) para os genes, das amostras C0 e C8.....	66
Tabela 8: Identificação da homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_00017 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, obtidos pelo programa <i>Blast</i>	71
Tabela 9: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_06114 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	72
Tabela 10: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_01887 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	72
Tabela 11: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_05408 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	73
Tabela 12: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_04160 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	74
Tabela 13: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_03746 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	75

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – TESE	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Representação Esquemática.....	22
3.2. Micro-organismos.....	25
3.3. Descontaminação do Caldo de Cana de Açúcar.....	25
3.4. Fermentação Alcolólica.....	25
3.4.1. Escalonamento Celular.....	25
3.4.2. Ciclos de Fermentação Alcolólica.....	26
3.4.3. Viabilidade Celular – <i>Live Dead - Yeast</i> [®]	27
3.4.4. Atividade Metabólica – XTT.....	28
3.4.5. Assimilação de Açúcares e Produção de Etanol – HPLC.....	29
3.5 Transcriptoma.....	30
3.5.1. Extração de RNA da cepa contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) e da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2).....	30
3.5.2. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras (C4 e PE-2).....	31
3.5.3. Construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA) – <i>Candida tropicalis</i> (C4).....	31
3.5.4. Clusterização e sequenciamento (<i>MiSeq</i>) das amostras de <i>Candida tropicalis</i> (C4).....	32
3.5.5. Análise dos dados de sequenciamento das amostras de <i>C. tropicalis</i> (C4).....	33
3.5.5.1. Qualidade, Limpeza, Quantificação e Normalização dos Dados.....	33
3.5.5.2. Análise Diferencial da Expressão Gênica.....	34
3.5.5.3. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos.....	34
3.5.5.4. Análise de Enriquecimento: Ontologia dos Dados da Expressão Gênica.....	34
3.6. miRNAs.....	35
3.6.1. Triagem de miRNAs validados em espécie de cana de açúcar (<i>Saccharum ssp.</i> e <i>Saccharum officinarum</i>).....	35
3.6.2. Obtenção do RNA total, quantificação e avaliação da integridade.....	35
3.6.3. Síntese de cDNA – miRNAs.....	35
3.6.4. Expressão dos miRNAs por RT-PCR.....	35
3.6.5. Análise de Dados e Bioinformática – miRNAs.....	36
3.6.5.1. Identificação Funcional dos miRNAs.....	37
3.6.5.2. Análise Interação miRNA-Gene/Alvo.....	37
3.6.5.3 Rede de Interação miRNA- Gene/Alvo.....	37
3.6.5.4. Alinhamento Gênico de <i>Candida tropicalis</i> e micro-organismos contaminantes e não-contaminantes.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Fermentação Alcolólica.....	38
4.1.1. Escalonamento Celular.....	38
4.1.2. Ciclos de Fermentação Alcolólica.....	38
4.1.3. Viabilidade Celular – <i>Live/Dead- Yeast</i> [®]	39
4.1.4. Atividade Metabólica – XTT.....	41
4.1.5. Assimilação de Açúcares e Produção de Bioetanol.....	42
4.2. Extração de RNA das amostras de contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2).....	46
4.3. Transcriptoma.....	48
4.3.1. Dados do Sequenciamento e Mapeamento do genoma de <i>Candida tropicalis</i>	48
4.3.2. Análise Diferencial da Expressão Gênica das amostras de <i>Candida tropicalis</i>	48
4.3.3. Análise das Enriquecimento das amostras de <i>Candida tropicalis</i> – Gos.....	50

4.4. miRNAs.....	55
4.4.1. miRNAs – Cana de Açúcar.....	55
4.4.2. <i>DataAssist</i>	56
4.4.3. Funções dos miRNAs Diferencialmente Expressos: <i>psRNA Target s Plant Small RNA Target Analysis</i>	63
4.4.4. Predição de Alvos miRNAs – miRNA-Gene/Alvo.....	66
4.4.5. Alinhamento Gênico de <i>Candida tropicalis</i> e micro-organismos contaminantes e não contaminantes: <i>Blast</i>	70
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
Anexo I: Dados de Expressão da placa de caldo d cana de açúcar, evidenciando a expressão dos 25 miRNAs selecionados	96
Anexo II: Sequências Gênicas dos possíveis alvos encontrados na Interação miRNA-gene/alvo, utilizados pelo programa <i>Blast</i> para os alinhamentos.....	101
CAPÍTULO 2 – ARTIGOS	110

1. INTRODUÇÃO

No último século, as recorrentes crises no petróleo mundial resultaram em graves crises econômicas, levando a busca de combustíveis alternativos. No Brasil as consequências foram severas devido a dependência do país, que importava cerca de 85% de seu consumo total (Manual de Recomendações, 1990).

Em 1930, o Brasil apresentou o primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool que visava estabelecer a infraestrutura para a produção e a utilização do bioetanol (Moreira *et al.* 1996), resultando para o país, o início de suas atividades na produção desse combustível no século XX (Amorim *et al.*, 2011).

O bioetanol tinha sua produção centralizada, levando assim a uma quantidade inferior de produção para o consumo totalitário, quando comparado com a utilização dos combustíveis derivados do petróleo, levando o Brasil ainda a se colocar em dependência do petróleo para suprir o consumo do país (Macedo, 2008).

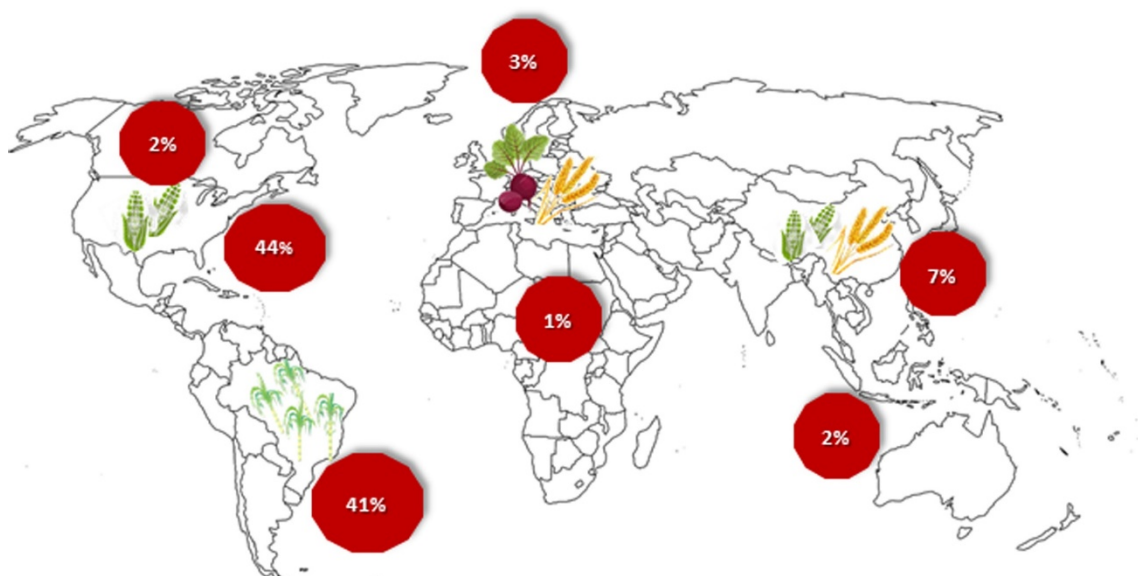
Diante da situação de baixa produtividade, o governo nacional anuncia o lançamento do Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), na década de 70, visando estimular a produção de bioetanol, para garantir a demanda de mercado externo e interno de um novo combustível, que além de acarretar positivamente a economia do país, contribuía para a redução de problemas ambientais provenientes da produção de derivados do petróleo, estabelecendo um novo comportamento para a qualidade do ar e também de desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, como tecnologias na área de alternativas energéticas (Zanin, 2000).

O ProÁlcool representou o maior aumento da produção de bioetanol, passando de 500 milhões de litros no início do programa para cerca de 13 bilhões de litros por ano a partir do seu lançamento (Zanin, 2000). Desde então, o Brasil é caracterizado como o pioneiro e mais competitivo produtor de bioetanol a partir da matéria prima cana de açúcar, e com uma política interna de consumo bem desenvolvida (Goldemberg, 2008; Amorim *et al.*, 2011).

Atualmente, o Brasil possui uma estimativa de produção com a safra 2017/2018 de 635,6 milhões de toneladas de cana de açúcar, sendo 39,46 milhões de toneladas de açúcar, 27 bilhões de litros de bioetanol (11,18 bilhões para etanol anidro e 15,87 bilhões para etanol hidratado de litros) como aponta os dados da Campanha Nacional de Abastecimento CONAB (Conab, 2018). Desde 1986 toda a produção de bioetanol é proveniente da cana de açúcar, representando uma tecnologia de larga escala com aumento anual caracterizado pelo desenvolvimento de novas variedades dessa planta associadas às novas tecnologias agrícolas (Zanin, et al., 2000; Amorim, et al., 2005; Amorim et al., 2011).

As três maiores potências mundiais na produção de bioetanol são o Brasil (cana-de-açúcar), EUA (milho) e China (trigo e milho), sendo as duas últimas pela produção através de grãos. Estimativas indicam que cerca de 85% do bioetanol mundial é de responsabilidade da produção brasileira e norte-americana, além de produções inferiores em todos os continentes, como mostra a figura 1 (Beltrame et al, 2016).

Figure 1: Distribuição global da produção e percentual de produção por continente: Américas: América do Sul - Brasil 43% (cana de açúcar); América do Norte: EUA 44% (milho) e Canadá 2%; Europa 3% (legumes e trigo); África 1% e Oceania 1%.



A cana de açúcar utilizada para a produção de bioetanol é derivada de aproximadamente 637 espécies conhecidas como: gramíneas perenes altas do

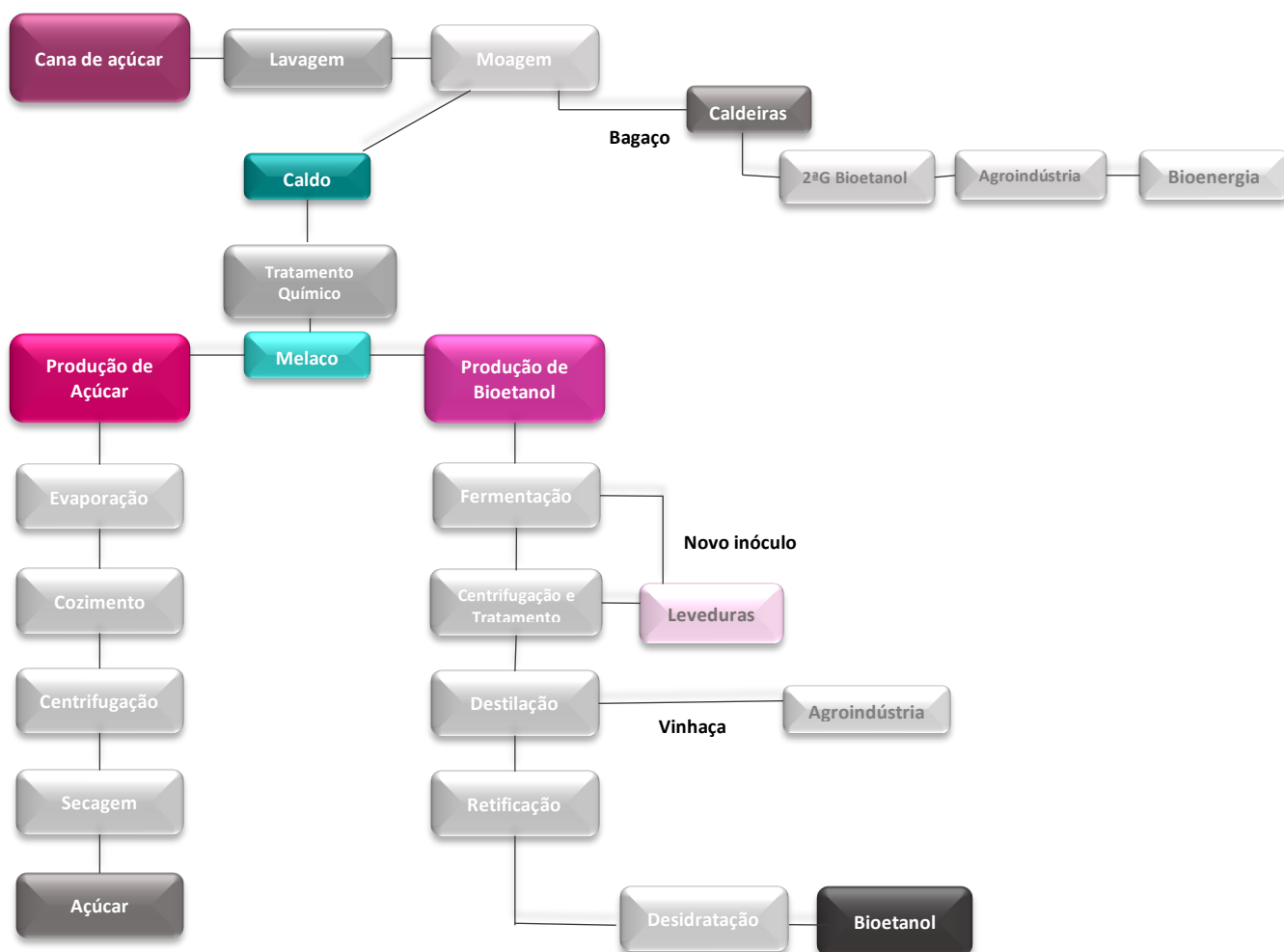
reino *Plantae*, gênero *Saccharum spp*, família *Poaceae*, nativa de clima temperado quente, sendo sua morfologia composta de haste e palha (Paes et al., 2005; Canilha et al., 2012). Rotineiramente as usinas sucroalcoleiras cultivam híbridos derivados de cruzamentos principalmente entre *Saccharium officinarum* e *Saccharium spontaneum* (Dillon et al., 2007).

A produção sucroalcooleira brasileira é derivada de uma fonte de dissacarídeo, proveniente da extração do caldo da cana de açúcar, a sacarose. A fermentada é o conjunto de micro-organismos, em especial leveduras, para ao final do processo fermentativo resultar na produção do bioetanol e seus subprodutos (Brow, et al., 2013).

O processo fermentativo é conhecido desde a antiguidade, sendo caracterizado como um processo bioquímico e biológico complexo, que tem como objetivo a ilação do açúcar a álcool etílico (anidro e hidratado), gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis e ésteres (Oliveira, 1960).

O processo de fermentação brasileiro atualmente utilizado é conhecido como batelada, encontrado em cerca de 70% das usinas, no qual ocorrem curtos ciclos de fermentação (6 a 10 horas) e tratamento celular com ácido sulfúrico ao final de cada ciclo, como mostra a figura 2 (Lopes, et al., 2016). Essa etapa constitui a chave principal do processo batelada, tendo como objetivo principal minimizar os riscos de contaminação e ainda assim, utilizar essa biomassa celular tratada como novo inóculo para posteriores ciclos fermentativos. Este tratamento celular é repetido durante toda safra anual no período de 6 a 9 meses (Brow, et al., 2013).

Figura 2: Esquema simplificado do funcionamento de uma usina sucroalcooleira no processo batelada, com suas principais fases para produção de açúcar e bioetanol.



No processo de fermentação, o suco da cana extraído da moagem é utilizado como a matéria prima, misturado à água e micro-organismos, obtendo como produto final um bioetanol de 9 a 12 % (v/v) (Andrietta et al., 2007; Basso, et al., 2008; Pereira et al., 2012; Babrzadeh et al., 2012). Atualmente, o micro-organismo mais utilizada no setor sucroalcooleiro é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ssp. em razão de sua diversidade e adaptação a diferentes condições do meio durante todo o processo fermentativo (Liti et al, 2009).

Com o avanço da produção nacional de bioetanol, em meados dos anos 90, era usual utilizar leveduras de indústria de panificação como inóculo de partida onde, ela conferia ao processo fermentativo vantagens como rápida

atividade, e baixo índice de problemas no rendimento durante a fermentação, constituindo para a época, a melhor escolha (Amorim et al, 2011).

Quanto a este tipo de fermento, a grande mudança ocorreu quando os estudos microbiológicos avançaram e constataram que as leveduras utilizadas como partida inicial, eram grandemente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra, levando então aos produtores a informação de que, as únicas leveduras que possuíam a capacidade de sobreviver em todos os ciclos até o final, eram as isoladas nativas (isoladas da própria usina). Estas eram provenientes de safras anteriores e no momento da centrifugação, tratamento e reutilização eram utilizadas como novo inóculo. Assim, nos anos 90 começava a propagação das próprias linhagens de leveduras nas usinas brasileiras. (Basso et al, 1993).

Um trabalho pioneiro nesse ramo de propagação de leveduras ocorreu acidentalmente pelo professor Jayme Rocha de Almeida (ESALQ-USP) nos anos 50, onde ao colocar a mão em uma dorna de fermentação em que fermentava uma levedura importada e posteriormente as limpar em um lenço, que carregava consigo, despropositadamente deu o início ao método de propagação de leveduras nativas. Mais tarde em seu laboratório, ao isolar o que tinha da amostra, verificou que não se tratava mais da levedura importada e sim de duas linhagens nativas, denominadas de IZ 1830 e IZ 1940 (Amorim et al, 2005).

Esse processo durou pouco tempo, visto que a propagação em larga escala dessas leveduras era um meio que apresentava dificuldades, desestimulando os produtores, revertendo a fermentação para a partida com leveduras de indústrias de panificação. Atualmente esse processo é bem estabelecido, fornecendo as usinas, biomassa em larga escala de leveduras nativas isoladas de suas próprias usinas (de onde ocorre a derivação da nomenclatura da levedura) e de seu próprio processo fermentativo, como as conhecidas leveduras da espécie *S. cerevisiae*: PE-2 (Usina da Pedra), SA-I (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), BG 1 (Usina Barra Grande), entre outras (Andrietta et al, 1997).

Embora o processo de produção de bioetanol da primeira geração seja muito difundido no Brasil, ele ainda apresenta condições avessas e emergentes, principalmente referente à esterilidade, levando a importantes quadros de contaminações microbianas durante o processo (Basso et al, 2011).

Na fermentação o ambiente industrial é complexo, caracterizado por um bioma diversificado de micro-organismos. Desta forma, é importante a compreensão desse ecossistema industrial, bem como, dos nichos que são criados durante um novo processo. Por outro lado, estes micro-organismos devem ser identificados, pois podem atuar como contaminantes interferindo de modo negativo todo o processo de fermentação (Costa et al, 2015).

As contaminações podem derivar do solo, planta, práticas agrícolas, extração e equipamentos industriais, destacando o fato de que os micro-organismos contaminantes mais encontrados são os que normalmente habitam a microbiota do solo da plantação da cana de açúcar (Bassi et al, 2013; Ward, 1991).

No momento da colheita da planta existe a atividade de corte (manual ou mecânico) e posteriormente o armazenamento desta para a coleta. Nesse momento essas plantas podem entrar em contato com o solo e através das fissuras do corte, esses micro-organismos contaminantes habitantes do solo podem entrar, invadir e colonizar os tecidos vegetais (de Souza et al, 2016).

Assim uma planta de cana de açúcar sadia carrega consigo habitualmente níveis de 10^3 a 10^4 micro-organismos por grama de planta. Mesmo com todos os cuidados básicos e corretos nas usinas, ainda terá um caldo misto de micro-organismo com contaminantes em torno de 10^6 células/mL (Amorim et al, 2009). Entretanto, um processo de fermentação considerado adequado é o que possui níveis de contaminação menores que 10^6 células/mL (Ducan et al, 1964; Hamonts et al, 2018).

Além disso, o caldo de cana pode sofrer interferência de contaminações em todas as etapas do processo (moagem, trocadores de calor, preparo e adição de insumos) até chegar ao ponto da fermentação. E, para os contaminantes, o caldo de cana de açúcar é um meio de cultura extremamente

rico, que estimula e favorece o crescimento microbiano, através de condições ideais como temperatura, pH, sais minerais, carboidratos e água (Basílio et al, 2008).

Contaminantes de origem bacteriana são bem descritos e possuem efeitos adversos na fermentação. Os gêneros mais comuns são: *Bacillus ssp.*, *Achromobacter ssp.*, *Micrococcus ssp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter ssp.*, *Flavobacterium ssp.*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas ssp.*, *Erwinia ssp.*, *Xanthomonas ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Corynebacterium ssp.*, e *Leuconostoc ssp.* (Basílio, et al 2008; Egea, et al 2018).

Dentre os grupos bacterianos, as bactérias gram positivas são as mais predominantes nos isolamentos. Dentro dessa taxa, o gênero *Lactobacillus* é o mais abundante, seguido do gênero *Bacillus* (Seki, et al 1990; Dellias et al, 2018).

Contaminações fúngicas também são encontradas, e trabalhos relatam a atividade de espécies como: espécies não-*Saccharomyces*, *Candida ssp.*, *Torulopsis ssp.*, *Rhodotorula ssp.*, *Pichia ssp.*, *Komagataella ssp.*, *Ascodeia ssp.*, *Septoria ssp.*, *Rasamsonia ssp.*, *Dekkera ssp.*, *Torulopsis ssp.* e *Schizosaccharomyces ssp.* como potenciais contaminantes (Cabrini, et al 1999).

Em um estudo específico para identificar a taxa de micro-organismos do fermento tratado, revelou a predominância do gênero *Saccharomyces* com cerca de 88%, seguida do gênero *Candida ssp.* com 12%, mostrando um grau significativo de contaminação por espécie não-*Saccharomyces* (Cabrini, et al 1999; Basílio, et al 2008; Szulc, et al 2017).

Independente da origem do contaminante, agindo isolado ou concomitantemente, há o risco e preocupação com problemas relacionados à produtividade, já que esses atuam diretamente na performance do processo fermentativo (Nobre, et al 2007).

Problemas de redução de produtividade estão diretamente ligados à competição de nutrientes para crescimento celular (mais específico o consumo

de açúcares), síntese e liberação de toxinas, produção de ácidos orgânicos (búterico, acético, fórmico e láctico), floculação (perda de fermento nas dornas) e ação do excesso de antibióticos no controle das contaminações, afetando a viabilidade da levedura padrão (Chang, et al 1995; Skinner, et al 2004; Zabed, et al 2014).

Produção de toxinas, ácidos e floculação, são problemas relacionados as bactérias contaminantes, principalmente as lácteas como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, que são responsáveis pelo aparecimento da floculação (Peng et al, 2001; Narvhus, et al 2003).

Os *Lactobacillus* interagem com as leveduras, onde através de ligação entre moléculas, se aderem à parede leveduriforme fazendo com que essa biomassa se condense e precipite. O *Leuconostoc* por sua vez, utiliza o açúcar do meio para formar uma espécie de goma, que ajuda na condensação das leveduras, favorecendo a floculação (Alvarez et al, 2014)

Alguns outros gêneros como *Bacillus*, *Acetobacter* juntamente com os produtores de floculação, são capazes de formar os ácidos, que diretamente afetam a viabilidade da levedura padrão (Carvalho-Neto et al, 2015; Tiukova, et al 2014)

Em relação à competitividade de nutrientes, este problema não somente pode ser causado pelas bactérias, mas também por outras leveduras que não sejam do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, visto que algumas espécies como *Candida tropicalis*, *Pichia pastoris*, *Dekkera bruxellensis*, também possuem comportamento similar à levedura padrão, como utilização e conversão de açúcares, além de possuírem alta resistência as adversidades do processo, podendo em casos extremos chegar a 30% do volume total de micro-organismos contaminantes de uma dorna de fermentação (Cabrini, et al 1999; Bassi, et al 2013; Costa, et al 2015).

A *Candida tropicalis*, foi isolada primeiramente de um paciente com bronquite fúngica no ano de 1910 e primeiramente chamada de *Oidium tropicale*. Estudos posteriores mostraram que se tratava de uma levedura, que pertencia ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, Classe *Sacchamycetales*, família

Saccharomycetaceae, gênero *Candida*, espécie *tropicalis* (Castelani et al 1912; Diezmman, et al 2004).

Sua macromorfologia compreende colônias de aspecto cremoso e aparência lisa, coloração branca a creme podendo apresentar bordas levemente enrugada. Sua microscopia possui como características a presença de blastoconídeos esféricos ou ovoides, isolados ou agrupados, podendo apresentar também pseudo-hifas ou até mesmo hifas verdadeiras como a *Candida albicans*. (Zuza-Alves et al, 2017).

Com relação às características bioquímicas, a *C. tropicalis* é capaz de fermentar alguns tipos de açúcares como: galactose, glicose, maltose, carboidratos como a trealose, e tendo como particular a assimilação de sacarose (Kutzman et al, 2011; Silva et al 2012).

É uma levedura comensal e aderente, mas também muito isolada de ambientes, com ampla distribuição em países tropicais e subtropicais (Kumar, 2018). Possui extrema relevância médica, pois é um tipo de micro-organismo que pode apresentar resistência a medicamentos como os derivados azólicos, anfotericina B e equinocandinas (Seneviratne et al., 2016).

Contudo a *C. tropicalis* tem obtido uma relevância importante por apresentar características de osmotolerância, fazendo com que essa levedura seja atualmente utilizada como potencial micro-organismo em processos biotecnológicos, como a produção de bioetanol e xilitol (Zuza-Alves et al 2016).

C. tropicalis é uma levedura diplóide e assexuada, seu genoma foi sequenciado em 2009, possui um tamanho de 14,5 Mb, com aproximadamente 12 cromossomos e contem 6.258 genes codificadores de proteínas (Doi et al., 1992).

Possui maior similaridade genética com *C. albicans* do que as outras espécies de *Candida* de interesse clínico, mas estudos mostram uma relação evolutiva com outros tipos de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparadas com características fenotípicas e bioquímicas para processos biotecnológicos (Butler et al., 2009; Wu et al., 2014).

Nas usinas brasileiras os métodos para determinação das contaminações ainda são muito restritos, visto que as metodologias mais empregadas são as de maior rapidez e baixo custo (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015). Habitualmente é utilizada a contagem microscópica dos micro-organismos, um método rápido mas muitas vezes inconclusivo, pois artefatos do meio podem ser confundidos com contaminações, e também apresenta a desvantagem de não poder oferecer informações com segurança sobre viabilidade, tanto das leveduras padrões, quanto de qualquer contaminante que possa estar interferindo no processo (Jornal da Cana, 2014)

Em associação com a microscopia as usinas utilizam a coloração de Gram, permitindo um melhor direcionamento quanto à identificação do micro-organismo, como gram positivo ou gram negativo (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015)

Além disso, em muitas usinas é utilizada a contagem de colônias em placas contendo meio sólido, que permite afirmar com segurança e porcentagem de células viáveis da levedura, bem como do contaminante (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015).

Esse padrão de identificação de micro-organismos nas usinas começou através da utilização de um meio seletivo, na década de 50, que tinha como objetivo a inibição do crescimento de leveduras com a utilização da actidiona (cicloheximida). Atualmente esse composto é proibido e as usinas utilizam como escolha de partida, um meio complexo onde há crescimento de múltiplas espécies (Copersucar, 1987).

Sendo assim, os meios seletivos são utilizados para direcionar sobre informações do contaminante, quanto a sua especificidade como, por exemplo, se são: bactérias totais, gram positivas, gram negativas, produtoras de goma, produtoras de ácidos, sempre buscando a peculiaridade de cada micro-organismo que deseja disseminar (Jornal da Cana. 2014).

Com as desvantagens de tempo e imprecisão de algumas metodologias mais clássicas, atualmente as usinas estão se beneficiando do uso de kits comerciais, como o Kit MC[®] (MC Desinfecção Industrial), que proporciona um

rastreamento do controle biológico por plaqueamento de diversas amostras. Além de ser um método fácil de manuseio, apresenta um resultado com maior precisão e rapidez (Jornal da Cana, 2014).

Algumas equações como Índice de Contaminação (IC), taxas de multiplicação do fermento (TMF), Recirculação Bacteriana (RC) são utilizadas pelas usinas como padrão de manutenção para contaminações (Copersucar, 1987)

Tratamentos para conter os contaminantes, são realizados através da utilização de antibióticos industriais (carbamatos, compostos quaternários, fenóis halogenados), estes são caracterizados como compostos orgânicos naturais ou sintéticos e têm o objetivo de inibir o crescimento ou causar a morte do micro-organismo contaminante. Possuem como principal característica a seletividade do alvo e desvantagem o alto custo e a promoção da resistência a alguns micro-organismos (Alcarde et al, 2003; Eughi, 2007).

Os antimicrobianos industriais utilizados na fase exponencial do crescimento dos micro-organismos na fermentação possuem diferentes tipos de ação, como bacteriostático (inibição de crescimento e sem morte celular), bactericida (presença de morte e ausência de lise celular) e bacteriolítico (presença de morte e lise celular) (Eughi, 2007).

Na indústria sucroalcooleira, os antimicrobianos efetivos possuem uma especificidade seletiva, fazendo com que estes, sejam representados por diversas substâncias, classificados quanto ao seu mecanismo de ação, como mostrado na tabela 1 (Oliveira, 1996; Denyer et al, 2002).

Tabela 1: Principais antimicrobianos, tipo e mecanismo de atuação destes compostos utilizados nas usinas sucroalcooleiras.

Antimicrobiano	Tipo	Mecanismo de Ação	Referência
Penicilina	B-lactâmico	Inibição da síntese de parede celular	Bischoff et al, 2007
Cloranfenicol	Amplio Espectro Gram + e Gram -	Inibição da síntese proteica	Pelczar et al, 1997
Monoensina sódica	Inóforo Bactericida	Utilizado como aditivo na alimentação de animais e em fermentação inibição da síntese de parede celular	Lopes et al, 2011
Tetraciclina	Amplio Espectro Gram + e Gram -	Síntese Proteica, inibindo replicação	Lui et al, 2016
Kamoram®	Bactericida	Inibição de síntese de parede, similar a moensina sódica	Revista Química Real, 2009
Oxitetraciclina	Amplio Espectro Gram+ e Gram -	Síntese Proteica, inibindo replicação	Pelczar et al, 1997
Estrptograminas (Virginamicina, Pristidamicina, Micamicina, Vernamicina)	Gram +	Síntese Proteica, inibição de cadeias peptídicas	Andreotti et al, 2004
Clindamicina	Gram +	Inibição da síntese proteica	Bischoff et al, 2007
Dióxido de Cloro (Diox®)	Desinfetante Bactericida	Inibição da síntese de parede celular	Meneguín et al, 2008
Biocidas Naturais a Base de Lúpulo	Bactérias Gram +	Transporte de metabólitos e modificação de pH intracelular	Ruckle et al, 2012

Um dos primeiros antimicrobianos foi o hexaclorofeno, presentemente sem utilidade, mas quando aplicado, apresentava boa taxa de fermentação. Atualmente se aplica uma combinação de antimicrobianos na etapa lavagem, com associação de ácido sulfúrico e posteriormente a administração antibiótico de escolha (Oliveira, 1996).

O uso excessivo desses antibióticos mostraram ao longo do tempo um quadro de resistência dos micro-organismos, além de geração de resíduos encontrados na vinhaça, sendo prejudicial e proibido para a utilização desta nos subprodutos da fermentação. Diante desses fatos, pesquisas vêm apontando para a produção de antimicrobianos naturais, conhecidos como biocidas (Ruckle et al, 2006).

A aplicação dos biocidas naturais tem um crescimento significativo na utilização de usinas e sua aplicação é empregada com sucesso contra micro-organismos contaminantes, auxiliando o controle e reduzindo principalmente a quantidade de resíduos. Outro ponto favorável quanto à escolha destes, é que em questões econômicas, os antibióticos convencionais são de alto custo, enquanto os biocidas são de custo inferior (Carrilo-Neves et al, 2017).

Em muitos países o problema de geração de resíduos é tratado como saúde pública, onde é proibida a utilização dos subprodutos da fermentação, como a levedura seca para fins de ração animal, por conta das altas dosagens de antibióticos (Christofoletti et al, 2013).

Autoridades regulatórias para detecção de resíduos de antibióticos são vigentes na maioria dos países, principalmente para utilização do sub-produto, a levedura seca. Esses órgãos de fiscalização promovem a quantificação dos resíduos, a informação para a diminuição do uso de antibióticos convencionais, o problema da resistência dos micro-organismos e a propagação para o aumento da utilização dos biocidas (Christofoletti et al, 2013).

Biocidas naturais são formulações ou produtos específicos, utilizados na desinfecção do mosto, tanque e equipamentos utilizados nas usinas sucroalcooleiras. Vários destes já são bem estabelecidos e atendem às exigências de fiscalização e das agências alimentícias em alguns países. Mas

ainda em alguns países como o Brasil, além de não apresentarem regulamentação nas agências de fiscalização também não estão nos padrões sanitários, sendo cada vez mais proibido o uso de sub-produtos da fermentação (Ji et al, 2016).

A ação dos antimicrobianos na contaminação por bactérias, principalmente as gram positivas é bem resolvida. Ainda assim, a existência da busca de um antimicrobiano ideal ainda se faz necessária (Cioch et al, 2017).

Em relação às contaminações fúngicas, pouco se conhece sobre a ação de antimicrobianos usados nesta área. A busca por um antifúngico sustentável, natural e de alta especificidade, seria essencial para as usinas, visando sua complementação contra os micro-organismos contaminantes totais do processo fermentativo (Branco et al, 2017).

Diante de novas tecnologias de estudos em níveis moleculares é interessante estudar como os micro-organismos fermentativos, *Saccharomyces cerevisiae* e contaminantes são adaptáveis a diferentes ambientes, revelando ser uma rica fonte de perfis fenotípicos na evolução das espécies (Lidzbarsky, et al., 2009; Liti, et al., 2009). Recentemente foi evidenciado que a interação do fator ambiental com micro-organismo pode influenciar na identificação de diferentes características específicas dentro de linhagens selvagens (Camarasa et al., 2011; Warringer et al., 2011). Por isso, os avanços de técnicas moleculares (*RNA-seq*, *CRYSIP*, *miRNAs*, *Microarray*) buscam elucidar as características fenotípicas e genotípicas das linhagens nativas e também dos contaminantes na produção de bioetanol, demonstrando melhorias no processo fermentativo (Boria, et al., 2013; Chowdhury, et al., 2014; Liu, et al., 2016).

As últimas décadas vêm demonstrando que o dogma central da Biologia Molecular modificou, revelando que estudos antes bem validados sobre informação genética de DNA para RNA resultando na formação de proteínas, pode sofrer algumas modificações como a descoberta dos chamados RNAs não codificantes (ncRNAs) (Costa, et al., 2012).

Os ncRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que afetam a estabilidade dos RNAs mensageiros atuando na expressão de transcritos, influenciando nos controles transcricionais e pós-transcricionais (Sesma, 2016). Nos seres vivos como humanos e espécie de camundongos a maioria de seus transcritos são definidos como codificantes, onde uma parcela de 2% e 37% respectivamente são não-codificantes, em valores totais de transcritos de um genoma de cada espécie em destaque (Wery et al., 2011). Ainda há uma taxa significativa de transcritos não-codificantes em outras espécies eucarióticas como leveduras, como por exemplo, na espécie *S. cerevisiae*, na qual cerca de 15% apresentam RNAs não-codificantes (Wery et al., 2011), além de plantas onde esses ncRNAs são bem conservados (Zanca et al., 2010).

Os ncRNAs estão divididos em três famílias: os microRNAs (miRNAs), piRNAs (*PIWI-interatives RNAs*) e os siRNAs (*small-interfering RNAs*). Estas famílias apresentam origens diferentes, porém, compartilham processos específicos da via biossintética e de mecanismos de regulação (Costa et al., 2012).

Os piRNAs são ncRNAs de aproximadamente 24-31 nucleotídeos e seus mecanismos foram, primeiramente, descobertos em *Drosophila sp* (Malone et al., 2009). piRNAs são encontrados em regiões específicas do genoma e estão diretamente ligados a transposons, cuja ação é caracterizada por estar envolvida na defesa celular, dentro da regulação de linhagem germinativa e, também, de células somáticas (Khanduja et al., 2016). Estes piRNAs estão associados a um determinado grupo da família de proteínas Argonautas, as proteínas PIWI (Thomson et al., 2009).

Os siRNAs por sua vez, são ncRNAs provenientes de produtos da catálise da ação da RNA polimerase na biogênese dos ncRNAs (Watanabe et al., 2008). siRNAs são bem descritos em plantas e estudos apontam para ação em biogênese de doenças como câncer, também estudados incorporadas à nanopartículas na área de resistência à fármacos, doenças, agentes infecciosos em plantações, entre outros (Khalid et al., 2017; Sun et al., 2017).

Dentre todos os ncRNAs reconhecidos e estudados, existe uma classe com um número maior de nucleotídeos (>200), os conhecidos longos miRNAs (lncRNAs) (Wilusz et al., 2016), estes lncRNAs são encontrados em células humanas ligadas a vários processos biológicos como regulação do genoma, modificações de histonas, metilação de DNA e também ação nos processos de biogênese de doenças (Han et al., 2016). Estudos com essa classe de ncRNAs tem mostrado sua ação em organismos eucariotos como leveduras (*S. cerevisiae*) na regulação de genes em resposta a mudanças ambientais, fatores de estresse e tolerância (Yamashita et al., 2016).

A classe mais conhecida dos ncRNAs, os miRNAs, são pequenas moléculas endógenas de aproximadamente 19-21 nucleotídeos e sua descoberta ocorreu primeiramente em *Caenorhabditis elegans* (Newman et al., 2010). miRNAs são encontrados em eucariotos superiores, inferiores, procariotos, vírus e plantas, capazes de regular vários processos biológicos pós-transcricionais, incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose, entre outros (Das et al., 2016; Zhang et al., 2010; Davis-Dusenbery et al., 2010). Os genes do miRNAs estão normalmente localizados em íntrons de proteínas codificantes e regiões intragênicas subjacentes, visto que estudos recentes revelam a ação dos miRNAs em regiões de exossomas celulares (Jovicic et al., 2017).

A biogênese dos miRNAs se inicia geralmente por um gene alvo ser adenilado na região 3' e com capacete de 5-metil-guanosina na extremidade 5', em seguida, pela ação normalmente da RNA Polimerase II (Pol II). O gene é transcrito formando uma estrutura conhecida como pri-miRNA que são transcritos primários (Starega-Roslan et al., 2011). Estes transcritos primários continuam com as adaptações da fita alvo e adiciona a eles à estrutura em *loop* conhecida como *hairpin* (Zeng et al., 2005). Esta estrutura é reconhecida por um complexo que é constituído por uma enzima ribonuclease III conhecida como DROSHA e proteínas DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*), ativando uma cascata de clivagens do transcrito primário (Starega – Roslan et al., 2011). A Drosha, por sua vez, cliva esse pri-miRNA na base da junção RNA-dsRNA que é reconhecida pela DGCR8, resultando em uma

estrutura menor de 60 nucleotídeos conhecida como pre-miRNA (Han et al., 2006; Basyuk et al., 2003). O pre-miRNA e seus produtos em nível nuclear são reconhecidos pela Exportina-5 (Exp-5) na qual desempenha função de transporte do pre-miRNA do núcleo ao citoplasma (Okada et al., 2009). Em nível citoplasmático a estrutura *hairpin* desse pre-miRNA é reconhecida por um complexo chamado de RLC, onde uma enzima denominada de DICER (ribonuclease III) converte o pre-miRNA em miRNA maduro. A Dicer reconhece os produtos deixado pela Drosha no final da 3' e cliva perto do *hairpin* esse pre-miRNA em uma estrutura dupla fita de aproximadamente 22 nucleotídeos (miRNA-miRNA) (Warf et al., 2011). A Dicer não possui ação sozinha, visto que ativa uma família de proteínas chamadas de Argonautas (AGO) que ao reconhecer o ponto de função da Dicer, se liga e direciona a estrutura miRNA-miRNA a seleção de uma das fita simples (MacRae et al., 2008). A junção do RLC e Argonautas é conhecida por complexo RISC; O RISC se liga a uma das fitas do miRNA-miRNA e a outra fita é degradada, resultando numa estrutura de fita simples de miRNA (Kawamata et al., 2010), que podem então atuar por complementariedade na degradação do mRNA ou parcialmente inibindo a tradução, visto que por ação um único mRNA pode conter vários sítios de ligação de ncRNAs diferentes, bem como um único ncRNAs pode regular vários sítios de mRNAs (Place et al., 2008).

Descritos para outra classe de miRNAs, os exógenos, conhecidos como XenomiRs, são de pequenos ncRNAs, que através da dieta, afetam diretamente o perfil celular, interferindo na homeostase dos miRNAs circulantes. Os XenomiRs possuem uma característica principal que é a capacidade de transferência interespecies (Winter, 2012). Estes miRNAs exógenos são encontrados em fluidos biológicos como sangue, plasma, urina e saliva e altamente estáveis e tolerantes a condições físicoquímicas como extremidades de pH e temperatura (Perge et al., 2016). Sua transferência ocorre por meio de vesículas incluindo exossomas e microvesículas, além de proteínas de alta densidade como HDL e proteínas que possuem similaridade com as dos miRNAs celulares (Witwer et al., 2014). A ação destes XenomiRs em níveis transcricionais e pós transcricionais são semelhantes aos demais miRNAs,

atualmente utilizado com muita relevância como potencial ferramenta de prognóstico de doenças, sendo conhecidos como biomarcadores (Fabris et al., 2016).

Dentre todos os organismos que possuem produção de miRNAs, as plantas são as que apresentam maior conservação desses ncRNAs, diferenciando dos miRNAs das outras espécies na biogênese. Em plantas, a biogênese desses miRNAs possuem algumas diferenças, iniciando-se com a transcrição do gene MIR por uma Pol II dentro do pri-miRNA. Este normalmente é uma fita simples de RNA longo que é parcialmente complementada, formando o *hairpin* (Ferreira et al., 2012). No núcleo o precursor de *stem-loop* é processado por proteínas como: *Dicer-like* (DCL1), *HIPONASTIC LEAVES 1* (HYL1) e *SERRATA*, resultando em uma dupla fita de RNA, conhecida como miRNA-miRNA (Chen et al., 2005). Essa dsRNA é metilada por uma enzima *HUA ENHANCER 1* (HEN1) e ao reconhecer esta metilação a proteína HASTY transporta esse miRNA-miRNA do núcleo para o citoplasma (Poething et al., 2005; Mallory et al., 2006; Zhang et al., 2010). No citoplasma a biogênese é semelhante a dos humanos, onde uma das fitas é introduzida dentro do complexo conhecido como RISC e as proteínas AGO1 atuam ligando por complementariedade o mRNA alvo, formando miRNA maduro. O miRNA regula a expressão do mRNA alvo clivando-o e, assim, reprimindo a transcrição ou a translocação (Qi et al., 2010). Os miRNAs são bem conservados nas plantas e cerca de 3.300 destes miRNAs estão depositados em bancos de dados como o miRBase (Griffiths-Jones et al., 2011). Descobertas vêm revelando que expressão de miRNAs são encontradas sempre em certos tecidos e ou tipo celular, além de estágios específicos de desenvolvimento, como por exemplo o miR403, miR444 e o miR528 (Carrington et al., 2011).

A cana de açúcar é uma das plantas que possui o genoma mais complexo em razão de seu número variado de ploidia, com isto cerca de 34 miRNAs específicos de cana de açúcar estão depositados nos bancos de dados (Souza et al., 2008). A manipulação gênica de miRNA na cana auxilia na resistência dessa planta à adversidade como estresse hídrico, salino, entre outros (Heck et al., 2011). Zanca e colaboradores foram os pioneiros nos

estudos dos miRNAs de cana de açúcar visando a análise de expressão em distintos tecidos e órgãos dessa planta (Zanca et al., 2010), revelando a caracterização de um miRNA específico (miR528) e seu alvo (Ferreira et al., 2012; Gentile et al., 2013).

Atualmente pesquisas são publicadas de ncRNAs em fungos mostrando que leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* possuem a capacidade de produção de ncRNAs (estes ainda chamados de miRNAs-like), como também possuir áreas de transcritos não codificantes que são formados através da biogênese geral dos ncRNAs (Sesma, 2016). Wu e colaboradores, demonstram que a levedura *S. cerevisiae* possui 85% de seu genoma transcrito, na qual 15% são não codificantes, divididos entre ncRNAs e várias regiões transcritas para transcritos não codificantes como CUTs (*Cryptic Unstable Transcripts*), SUTs (*Stable Unannotated Transcripts*), XUTs (*Xrn-1-sensitive Unstable Transcripts*), MUTs (*Meiotic Unannotated Transcripts*), TERRAs (*Telomeric Repeat associated cryptic ncRNAs*) e CD-CUTs (*Cytoplasmically Degraded Cryptic Unstable Transcripts*) todos estes capazes de agir em processos biológicos a níveis transcricionais e pós-transcricionais (Wu et al., 2012).

Além disso, estudos sobre as funções dos miRNAs no desenvolvimento das alterações nos processos biológicos para distintas espécies, mas principalmente de doenças como o câncer, faz com que os miRNAs sejam ferramentas e alvos para novas abordagens terapêuticas. Estudos funcionais confirmam que os miRNAs podem agir como supressores de tumor ou oncogenes (oncomiRs), miRNAs miméticos (ação reprimida) ou moléculas direcionadas aos miRNAs induzidos (antimiRs), mostrando resultados promissores para alguns miRNAs de ação terapêutica (Rupaimoole et al, 2017).

Neste sentido, controlar as contaminações do processo de fermentação e verificar o seu comportamento na presença de variedades de culturas de micro-organismos presentes é essencial, visto que a demanda de antibióticos utilizados como padrão ouro nas usinas são sempre os mesmos e prejudiciais.

Em vista disso, nosso estudo visa elucidar o comportamento de um contaminante relevante de fermento, *Candida tropicalis*, durante um ciclo de

fermentação, através de técnicas que conferem a capacidade fermentativa e concomitantemente realizar a triagem de miRNAs específicos da cana de açúcar, nas amostras de RNA total da levedura contaminante *Candida tropicalis*, afim de identificar genes alvos. Posteriormente, analisar *in silico* a presença destes genes alvos identificados em outras espécies contaminantes.

Os miRNAs selecionados (XenomiRs) são potenciais biomoléculas que podem atuar diretamente nos processos transcricionais e pós-transcricionais inibindo ou potencializando a ação gênica alterando o processos biológicos fermentativos. Dessa forma, miRNAs livres na dorna podem interferir de maneira controlada os contaminantes que competem com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de bioetanol. Os mecanismos desencadeados por esses miRNAs (XenomiRs) podem ser utilizados como estratégias alternativas no controle da contaminação nos processos fermentativos uma vez que, podem interferir inibindo rotas metabólicas essenciais da fermentação levando até mesmo a eliminação total dos contaminantes de forma a não interferir na levedura principal *S. cerevisiae*. Além disso, essa proposta visou a busca de molécula naturais, não geradoras de resíduos tóxicos, viabilizando a sustentabilidade.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Detectar RNAs codificantes e não codificantes, em particular miRNAs (XenomiRs), da cana de açúcar que interfiram na levedura contaminante *Candida tropicalis* durante o processo fermentativo, através da caracterização desses XenomiRs como possíveis interferentes em genes alvos presentes tanto em *C. tropicalis* como em outras espécies contaminantes por meio de estudos *in silico*, além de identificar biomoléculas extraídas dos estudos *in silico* de miRNAs e RNAs codificantes como possíveis alvos terapêuticos para descontaminação na produção de bioetanol.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar a descontaminação do mosto fermentativo para ensaios de fermentação alcoólica;

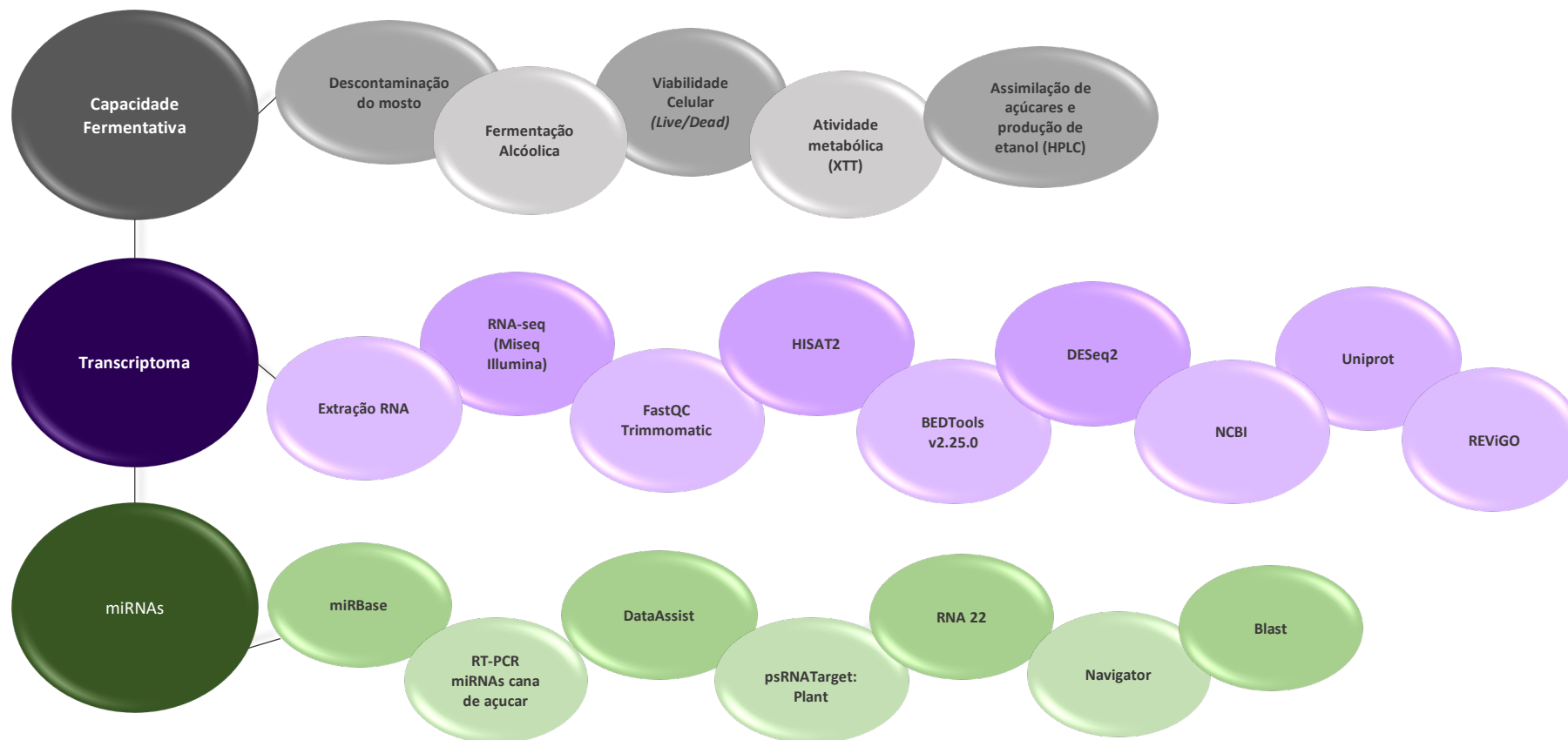
- Realizar ciclos de Fermentação Alcólica de 8 horas;
- Realizar todos os parâmetros do Padronização Fermentativa (viabilidade celular, atividade metabólica, assimilação de açúcares e produção de etanol) par as leveduras padrões de usina *Saccharomyces cerevisiae* e do contaminante *C. tropicalis*;
- Realizar extração e padronização de RNA para busca e identificação de rRNA e miRNA (xenomiRs) do contaminante *C. tropicalis* e da cana de açúcar;
- Realizar o sequenciamento global (RNA-seq) da levedura contaminante de *C. tropicalis* nos tempos de 0 e 8 horas de fermentação, para a obtenção da identificação da atividade funcional e comportamental perante ao processo fermentativo desse contaminante; Análise de dados gerados do RNA-seq utilizando ferramentas de bioinformática para quantificação, identificação e ontologia dos genes expressos;
- Realizar RT-PCR para identificar expressão de miRNAs específicos de cana de açúcar isolados e na presença do contaminante de *C. tropicalis*;
- Realizar a análise de expressão dos miRNAs pelos softwares: *DataAssist*;
- Realizar a busca *in silico* de possíveis alvos entre miRNAs encontrados na RTPCR e RNA-seq do contaminante por softwares de bioinformática;
- Realizar o alinhamento *in silico* dos miRNAs expressos em micro-organismos contaminantes e não contaminantes no processo fermentativo;
- Realizar a identificação e caracterização funcional *in silico* dos possíveis alvos miRNA para selecionar potenciais miRNAs antimicrobianos anti-leveduras contaminantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Representação Esquemática

A Figura 3 organiza de forma esquemática as metodologias correspondentes a cada uma das Ciências estudadas, destacando as abordagens desenvolvidas neste estudo: a capacidade funcional e comportamental da levedura contaminante *C. tropicalis*, sua expressão global gênica frente ao processo fermentativo e finalmente a interação da expressão gênica com RNAs não codificantes da cana de açúcar. Todas as metodologias buscam ao final, uma identificação de um possível biomarcador para a descontaminação fermentativa.

Figura 3: Representação esquemática das metodologias utilizadas em nosso estudo e suas Ciências. Destaque para as abordagens desenvolvidas neste estudo para a levedura contaminante *Candida tropicalis*: Capacidade fermentativa (cinzas), Transcriptoma – RNAs codificantes (roxo) e miRNAs – RNAs não-codificantes (verdes).



3.2 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram duas linhagens leveduriformes: *S. cerevisiae* PE-2 e um contaminante identificado de *C. tropicalis* MYA-3404 nomeada C4, isolado de dorna de fermentação alcoólica de uma usina do interior do estado de São Paulo, Brasil. Para todos os experimentos foram descongelados tubos de microcentrífuga com cultivos em meio líquido YEPD (extrato de levedura 1% - KASVI[®], peptona A 2% - Acumedia[®] e dextrose 2% Synth[®]) + 30% glicerol mantidos a -20°C e realizado em repique em placas de Petri do tamanho médio com meio YEPD sólido (extrato de levedura, peptona A, dextrose 2% e ágar bacteriológico HIMEDIA[®]) mantidos em temperatura de 30°C.

3.3 Descontaminação do Caldo de Cana de Açúcar

O caldo de cana de açúcar adquirido comercialmente foi primeiramente esterilizado por fervura (100°C) por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, filtrado em papel de filtro, para retirada de grandes resíduos derivados da moagem da cana. Finalmente esterilizado por calor úmido, em autoclave por 15 minutos a 120°C. Para se certificar da ausência de micro-organismos contidos nesse mosto (bactérias e leveduras), uma alíquota do caldo estéril foi plaqueado em Meio YEPD Sólido (para presença de leveduras) e Saboraud (Acumedia[®]) (para presença de bactérias) incubadas a 30°C por 24 horas.

3.4 Fermentação Alcoólica

3.4.1 Escalonamento Celular

O escalonamento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e contaminante *Candida tropicalis* (C4) foram iniciados através de uma quantidade de 10⁶ céls/mL em um Erlenmeyer (50mL) com 20% de seu volume total de meio líquido YEPD. Mantidos por 24h em agitação orbital (150rpm) e temperatura controlada de 30°C.

Posteriormente a este período, o cultivo foi centrifugado em tubos cônicos de 50mL na rotação de 4.000 rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* (biomassa celular) transferido para um novo Erlenmeyer (250mL), contendo 20% do volume total de meio YEPD líquido, mantido em agitação orbital (150 rpm) por 24 horas, temperatura controlada de 30°C, passado o período, o crescimento centrifugado, descartado o sobrenadante e adicionado o *pellet* a um novo Erlenmeyers (500mL) e o mantidos todos os

parâmetros e etapas de crescimento. Essa dinâmica de crescimento foi repetida nos volumes superiores Erlermeyers (1L e 2L), para uma ao final uma quantidade significativa de massa celular fosse adquirida.

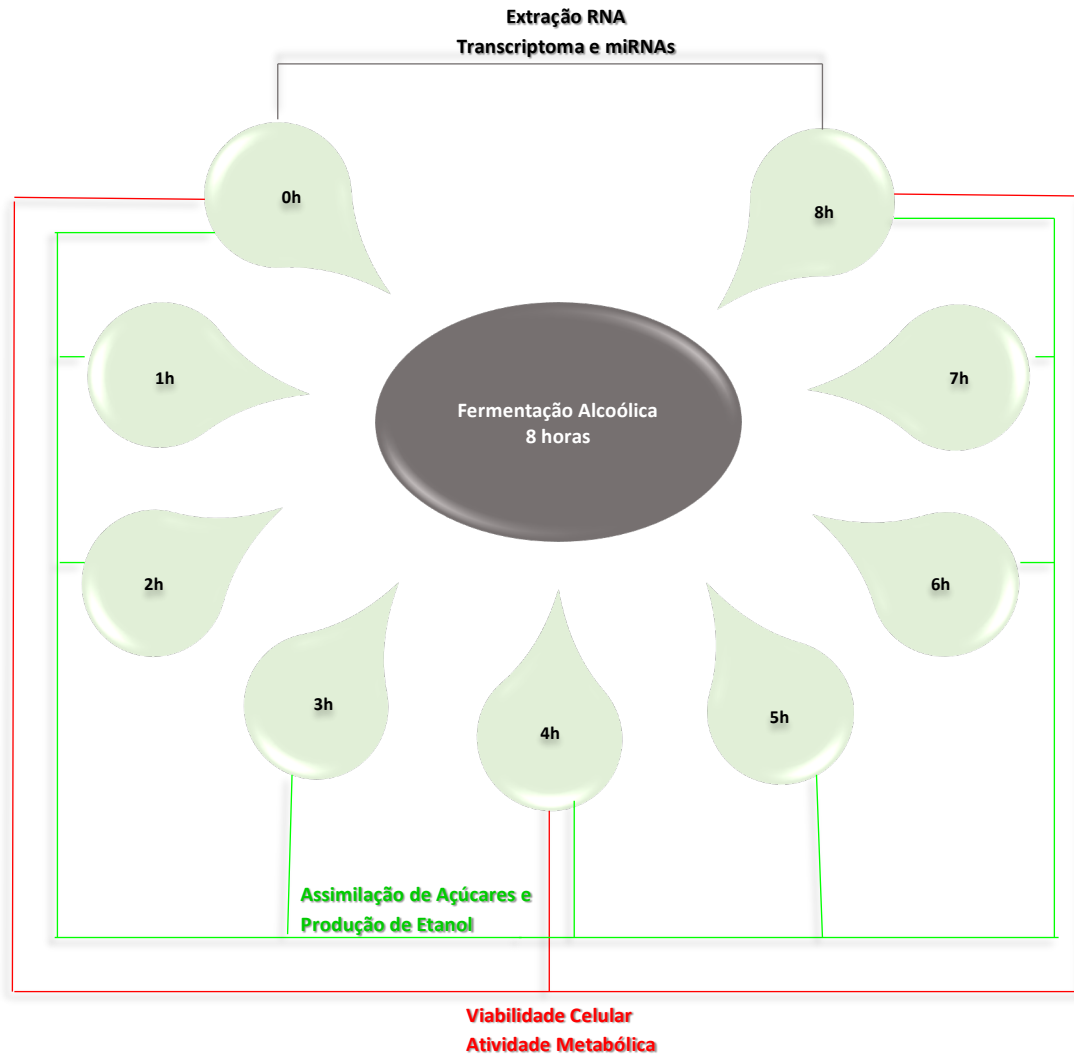
Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante a biomassa celular foi pesada em balança analítica e acondicionada em câmara fria até o momento do uso.

3.4.2 Ciclos de Fermentação Alcólica

Os ciclos de fermentação das linhagens PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e C4 (*Candida tropicalis*) foram realizados em Erlermeyer contendo 100 mL de caldo de cana estéril e 10% de biomassa celular (utilizada biomassa úmida), agitação orbital de 50 rpm, temperatura controlada de 30°C, com duração de 8 horas. Amostras a cada hora foram retiradas das duas linhagens PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e C4 (*Candida tropicalis*) e para este ensaio foram realizados três replicatas biológicas com duas replicatas técnicas.

Essas amostras foram obtidas para a realização de todas as metodologias do nosso trabalho: viabilidade celular (0h, 4h e 8h), atividade metabólica (0h, 4h, e 8h), assimilação de açúcares e produção de etanol (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8h) e extração de RNAs para transcriptoma e miRNAs (0h e 8h) como representado na figura 4.

Figura 4: Representação esquemática da retirada das amostras (em tempo) das duas linhagens PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e C4 (*Candida tropicalis*) no ensaio de fermentação alcoólica. Direcionamento das amostras e seus respectivos tempos nas em diferentes metodologias: Viabilidade Celular e Atividade Metabólica corresponde aos tempos na chave de coloração vermelha; Assimilação de Açúcares e produção de etanol corresponde aos tempos da chave de coloração verde; Extração de RNA para metodologia de transcriptoma e miRNAs corresponde a chave de coloração preta.



3.4.3 Viabilidade Celular (*Live/Dead – Yeast*[®])

Este ensaio foi realizado para amostras da linhagem PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e C4 (*Candida tropicalis*) nos tempos de 0h e 8h, utilizando o kit *Live/Dead*[®] (*Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA.*) que permitiu determinar a viabilidade celular com base na marcação fluorescente simultânea de células vivas e mortas, utilizando dois fluorocromos: a calceína AM e o homodímero de etídio (EthD-1). Este ensaio é aplicável às células eucarióticas, incluindo de fungos ou bactérias. As células vivas são distinguidas

pela presença da atividade intracelular da esterase, responsável pela conversão enzimática do corante calceína AM não fluorescente para calceína intensamente fluorescente. O marcador polianiônico calceína é retido dentro das células viáveis, resultando em uma intensa e uniforme fluorescência verde. EthD-1 penetra nas células com membrana danificada e após a ligação aos ácidos nucleicos, produz uma fluorescência vermelha brilhante em células mortas, sendo que tal composto é excluído pelas células vivas, que apresentam membrana plasmática intacta.

Os ensaios foram realizados segundo as recomendações do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução adicionando 20 µL da solução estoque EthD-1 2 mM em 10 mL de PBS estéril. A essa solução foram adicionados 5 µL de uma solução de calceína AM 4 mM. A solução de trabalho preparada resultou aproximadamente, em uma solução de calceína AM 2 µM (~494/517 nm) e EthD-1 4 µM (~528/617 nm) e então 100 µL desta foram adicionados diretamente às células após preparação prévia de inóculo 1×10^6 céls/mL das amostras (PE-2 0h e 8h C4 0h e 8H) e adicionados em placa de poliestireno de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Switzerland).

Em seguida, a placa foi incubada por 30 a 45 min em temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas pelo equipamento *IN Cell Analyzer 2000* (Ge Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) por objetivas de 20x e as análises foram realizadas utilizando o software *Investigator 1000 Workstation* (Ge Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0, *TwoWay-ANOVA* e *pos-test* Bonferroni. Os ensaios foram realizados em três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas.

3.4.4 Atividade Metabólica: XTT

Neste ensaio foi realizada a metodologia de XTT (Sigma®, St. Louis, Missouri, EUA) (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)] -2H-tetrazólio-hidróxido) (1mg/mL) em PBS + Menadiona (1mM em 10mm de acetona - Sigma®, St. Louis, Missouri, EUA) e todos os testes foram realizados em meio rico RPMI (meio tamponado com MOPS (Sigma®, St. Louis, Missouri, EUA), 0,165 mol/L + 2% glicose) para PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e C4 (*Candida tropicalis*). O princípio do ensaio de XTT se deriva da atividade da desidrogenase mitocondrial fúngica que quando ativa reduz o sal de tetrazólio XTT a

sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica, produzindo uma coloração alaranjada, correlaciona ao nível de atividade metabólica da levedura. A escolha do meio RPMI se deu por razões que o ensaio com este, é uma metodologia bem padronizada em nosso laboratório e também porque quando realizamos os mesmos ensaios em meio caldo de cana, havia presença de crescimento mas não foi possível verificar coloração. Uma das hipóteses é que o caldo de cana possua algum componente que inibe a conversão desse sal, fazendo com que tenha ausência de cor, por essa razão o descarte desse meio e escolha do RPMI.

Com isso, primeiramente, foi preparado um inóculo de 1×10^6 céls/mL em meio RPMI para todas as amostras (C4 0h e 8h e PE 0h e 8h) e posteriormente adicionado 100 µL destes a placa de 96 poços (*TPP®*, *Trasadingen, Switzerland*).

Em seguida para cada amostra foi adicionado 100 µL da solução de XTT + Menadiona, a placa então foi incubada por três horas à temperatura controlada de 30°C, sem agitação e sobre restrição de luz. Transcorrido este período, a placa foi realizado a leitura em aparelho *EPOCH/2- Microplate Reader (Biotek®) Software Gen5 2,09*, nos comprimentos de onda de 492nm. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism versão 5.0*, *TwoWay-ANOVA* e *pos-test Bonferroni*. Os ensaios foram realizados em três replicatas biológicas e três replicatas técnicas. (Pitangui et al, 2012).

3.4.5 Assimilação de Açúcares e Produção de Etanol - HPLC

Este ensaio foi realizado a metodologia de HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho), pelo laboratório multiusuário de Biotecnologia, localizado na faculdade de Bioprocessos e Biotecnologia – UNESP, Araraquara/SP. Para este ensaio foram retirados amostras de 1 mL a cada hora, durante o ciclo de fermentação de 8 horas.

As amostras então foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado com auxílio de filtro 22 µm e diluídas em água destilada estéril na proporção 1:100. Os valores de concentração de etanol e glicose foram determinados um sistema HPLC (*Shimadzu, Kyoto, Japan*), através da injeção das amostras em uma coluna de permuta iônica Aminex HPX-87H (300 cm x 7.8 mm) (*Bio-Rad, Hercules, CA, EUA*). Para separação e detecção das moléculas de sacarose, glicose frutose e etanol foi utilizado um detector de índice de

refração (RID-6a, Shimadzu, Kyoto, Japão). A fase móvel foi de 5 mM H₂SO₄ a um fluxo de 0,6 mL/min e a coluna mantida em temperatura de 45°C. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0, *TwoWay-ANOVA* e *pos-test* Bonferroni. Os ensaios foram realizados em duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas.

3.5 Transcriptoma

3.5.1. Extração do RNA da cepa contaminante *C. tropicalis* (C4) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2)

A extração do RNA das amostras (C4 0h e 8h) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 0h e 8 horas) foram realizadas utilizando o *RNeasy Plant mini kit*[®] (*Qiagen, Gaithersburg, MD*) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, cerca de 100 mg de células leveduriformes (*pellet* celular) de cada amostra foram rompidas com pérolas de vidro (3 mm) e congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 450 µL do tampão RLC (fornecido) para um máximo de 100 mg de células, que foram vortexadas vigorosamente.

Posteriormente, o lisado foi transferido para um pré-filtro acoplado a um tubo coletor de 2 mL (*QIAshredder spin column – Lilás*) e, então, centrifugado por 2 minutos a velocidade máxima (14.000 rpm). Em seguida, o pré-filtro foi descartado e o sobrenadante transferido cuidadosamente para um novo tubo de micro centrifugação. Ao lisado limpo, foi adicionado etanol v/v (96 – 100%) e homogeneizado vagarosamente.

A amostra mistura foi transferida para um novo pré-filtro acoplado a um tubo coletor de 2 mL (*RNeasy Mini spin column – Rosa*), novamente centrifugada por 15 segundos a uma rotação de 10.000 rpm e, após centrifugação, o líquido filtrado descartado. O pré-filtro foi acoplado ao mesmo tubo coletor e adicionado 700 µL do tampão RW1, centrifugado por 15 segundos a 10.000 rpm, do qual o líquido centrifugado foi novamente descartado.

Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão RPE e centrifugado por 15 segundos a 10.000 rpm, a partir do qual o líquido foi novamente descartado e esta etapa foi repetida por mais uma vez. Uma etapa adicional de secagem de membrana foi realizada, onde foi centrifugado as amostras em velocidade máxima por 1 minuto e ao final, a coluna de centrifugação foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL, e adicionados 50 µL de água RNase-free. A amostra foi centrifugada por 1 minuto a 10.000

rpm para eluição e os RNAs extraídos foram recolhidos em um único tubo. Para este ensaio foi realizado três replicatas biológicas com duas replicatas técnicas.

3.5.2. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras (C4 e PE-2)

As quantificações das amostras após extração dos RNAs foram realizadas em aparelho *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers* (Thermo Fisher Scientific-Waltham, Massachusetts, EUA), de forma a obter a concentração em ng/μL. Além disso, as purezas dos mesmos foram analisadas também pelo *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers* (Thermo Fisher Scientific- Waltham, Massachusetts, EUA) com base na razão da absorbância A260nm/A280nm, sendo descrita como pureza ideal, o intervalo de 1,8 a 2,0.

A integridade dos RNAs, por sua vez, foi avaliada utilizando o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer®* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante para amostras de eucariotos, portanto, considerando o parâmetro RNA *Integrity Number* (RIN) como um valor maior ou igual a 8.

3.5.3. Construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA) – *Candida tropicalis* (C4)

As bibliotecas de cDNA da amostras do contaminante *C. tropicalis*- 0h e 8h, foram preparadas segundo o protocolo *Kit de TrueSeq Stranded mRNA LT Kit* (Illumina, San Diego, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante com algumas adaptações descritas abaixo.

Inicialmente, os RNAm isolados e purificados foram fragmentados por ação enzimática e posterior ligação de *random primers* (oligonucleotídeos randômicos) para se proceder com a síntese da primeira fita dos cDNA, através da ação da enzima transcriptase reversa (*SuperScript/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Após a síntese da primeira fita dos cDNA, foi procedida para a etapa de síntese da segunda fita, tendo ao final do processo um cDNA dupla fita.

Então, esferas magnéticas (*kit Ampure XP beads*) foram adicionadas e realizado a reparação de fragmentos de cDNA não-coesivos das extremidades 3' e 5' usando o reagente *End-Repair Mix – Illumina* (Illumina, San Diego, CA, EUA). O *End-Repair Mix* tem uma atividade exonuclease, que remove as pontas das extremidades 3' e ativa a

polimerase que complementa as extremidades 5' do cDNA fragmentado. Deste modo, ao final desta etapa foram obtidos os cDNA fragmentados com suas extremidades coesivas.

Após esta etapa, a adenilação foi realizada, onde um único nucleotídeo A (adenina) foi aderido à extremidade 3' dos cDNA fragmentados e reparados, com a finalidade de prevenir que fragmento de cDNA se ligue erroneamente a outro fragmento de cDNA durante a ligação dos adaptadores. Esta estratégia garante uma baixa formação de quimeras e com isso, os adaptadores com *barcodes* específicos, foram ligados nas extremidades dos cDNAs fragmentados.

Posterior a ligação dos adaptadores foi realizado o enriquecimento dos fragmentos de cDNA através de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR). A PCR foi realizada utilizando *primers* que anelam às extremidades dos adaptadores, garantindo que apenas os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores sejam amplificados. Um total de 10 ciclos foram utilizados na PCR.

A biblioteca então foi produzida e posteriormente validada e quantificada. A validação das bibliotecas de cDNA de ambos os tempos 0h e 8h, foi realizada através de eletroforese capilar no *Agilent 2100 Bioanalyzer*[®] (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA*) com o chip específico para DNA (*Agilent DNA-1000, Santa Clara, CA, EUA*) utilizado 1 µL de cada biblioteca e as etapas desenvolvidas conforme as recomendações do fabricante.

A quantificação das bibliotecas foi realizada por qPCR (quantificação absoluta) utilizando aparelho *7500 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA*), de acordo com as recomendações do Guia *Illumina Sequencing Library qPCR Quantification* (*Illumina, San Diego, CA, USA*). Uma etapa de normalização de todas as bibliotecas foi adicionada para uma concentração de 2 nM. E, finalmente as bibliotecas de cDNA foram ajustadas para uma concentração final de 18 pM.

3.5.4. Clusterização e sequenciamento (*MiSeq*) das amostras de *Candida tropicalis* (C4)

Os sequenciamentos das bibliotecas de cDNA foram realizados no Laboratório Multiusuário para Sequenciamento de DNA e RNA em Larga Escala, gerido pelo laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, localizado no Campus da UNESP de Araraquara/SP utilizando a plataforma *MiSeq Illumina* (*Illumina,*

San Diego, CA, USA) e o kit de sequenciamento V3 - 150 ciclos (*Illumina*, San Diego, CA, USA), seguindo procedimentos recomendados pelo fabricante.

A técnica da *Illumina* é baseada no sequenciamento por síntese, no qual, bases únicas que constituem os quatro nucleotídeos (ACGT), são incorporados à fita de DNA, além incluir a utilização de um terminador reversível marcado fluorescentemente que ao final do sequenciamento gerando uma fluorescência específica para cada base incorporada. Nesse momento uma clivagem para permitir a incorporação da próxima base. Depois de cada etapa da síntese, os clusters são excitados por um laser emitindo a fluorescência da última base incorporada. Este sinal fluorescente é capturado por uma câmera, produzindo imagens da *flow cell*. Ao final deste processo, é feita a montagem das sequências específicas de cada uma das amostras. Foram realizadas duas replicatas técnicas para este ensaio.

3.5.5. Análise dos dados de sequenciamento das amostras de *C. tropicalis* (C4)

3.5.5.1 Qualidade, Limpeza, Quantificação e Normalização dos Dados

Os dados gerados pelo sequenciamento foram preparados e analisados de forma a obter o perfil de expressão gênica global do contaminante *C. tropicalis*, nos tempos 0h e 8h, bem como a variação de expressão existente entre elas. Essa análise foi realizada em parceria com o laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Ciências Biológicas – Instituto de Biociências, localizado no campus da UNESP da cidade de Botucatu/SP.

Inicialmente, foi realizada a triagem das sequências utilizando o *software FastQC* (disponível em <www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Conhecida como uma etapa de pré-processamento dos dados, possui a finalidade de verificação da qualidade das corridas dos sequenciamentos, e também observar a presença de alguns interferentes como: resíduo de ligação de adaptadores, leituras de baixa qualidade, bases sem ligação e contaminações.

Em seguida foi realizada a limpeza e a filtragem dos dados utilizando o *software Trimmomatic v 0.36* (Bolger et al, 2014). Esta etapa possui como finalidade exclusivamente aumentar a qualidade dos dados, removendo alguns interferentes. É uma etapa criteriosa, onde a avaliação de todos os parâmetros de corte de leituras foi realizada

com muito cuidado, afim de se conseguisse qualidade nas corridas, mas com todas as informações necessárias para as próximas etapas.

As leituras foram mapeadas sobre o genoma de *Cândida tropicalis* (número de acesso GCA_000006335.3) usando *HISAT2*, que consiste em um programa de alinhamento rápido e sensível, utilizado para mapeamento de nova geração para uma população de genomas ou um único genoma de referência. Esse alinhamento ocorre através de amplo conjunto pequenos índices genômicos com aproximadamente 56kp, que abrange todo o genoma sequenciado, permitindo um alinhamento preciso (Kim et al, 2015). A contagem de leitura por gene foi gerada usando *BEDTools intersect v2.25.0*, utilizando parâmetros padrão com base nas anotações do genoma. A contagem de leitura das amostras ao final foram normalizadas, para que uma melhor análise nas etapas posteriores de expressão diferencial fossem adquiridas (Quinlan et al, 2010).

3.5.5.2 Análise Diferencial da Expressão Gênica

O teste de expressão diferencial (C8 / C8 vs C0 / C0) foi realizado usando o programa *DESeq2*. Os genes com uma taxa de descoberta falsa (FDR) > 0,01 e *Fold Change* \log^2 com valores diferentes de 1 foram considerados diferencialmente expressos (Love et al, 2014).

3.5.5.3 Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos

A identificação dos genes diferencialmente expressos, filtrados pelos parâmetros acima enunciados (seção 3.5.5.2), foram identificados quanto a sua função pelo site NCBI (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) (NCBI, 2016).

3.5.5.4 Análise de Enriquecimento: Ontologia dos Dados da Expressão Gênica

Para esta análise, os termos da ontologia gênica (GOs) dos genes de *C. tropicalis* foram obtidos do banco de dados *UniProt* e um script interno do *Python v 3.5* contou a frequência de cada termo para os genes diferencialmente expressos (Wasmuth et al, 2016; Ashburner et al, 2000). E toda quantificação de frequência e termos ontológicos encontrados foram analisados pelo programa REViGO. Esse programa possibilita a análise de longas listas de termos ontológicos dos genes e os resume, removendo termos redundantes, além de possibilitar uma classificação funcional dos transcritos em três domínios: I) processo biológico, indica as operações ou os conjuntos de eventos

moleculares fundamentais que o gene estudado participa, seja em uma célula, tecido, órgãos ou organismo; II) função molecular, sugere as atividades elementares do produto do gene a nível molecular; III) componente celular, que indica a parte da célula ou o ambiente extracelular em que o produto do gene desempenha sua função. Estas anotações de ontologias gênicas são baseadas na mineração de dados originados de sequências públicas com anotação disponível, com similaridade mínima de 60% entre as sequências (Supek et al, 2011).

3.6 miRNAs

3.6.1 Triagem de miRNAs validados em espécie de cana de açúcar (*Saccharum ssp.* e *Saccharum officinarum*)

Para os ensaios dos miRNAs foram selecionados 25 miRNAs específicos da espécie *Saccharum ssp* e *Saccharum officinarum* da planta cana de açúcar, através do banco de dados do site miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

3.6.2 Obtenção do RNA total, quantificação e avaliação da integridade

As extrações dos RNAs celulares das amostras de *C. tropicalis* (C4), levedura *S. cerevisiae* (PE-2) tempo 0h e 8h e caldo de cana de açúcar (CC) para os ensaios de miRNAs foram seguidos os mesmos parâmetros de extração, quantificação e integridade, descritos na seção 3.5.1 e 3.5.2.

3.6.3 Síntese de cDNA - miRNAs

A síntese de cDNA das amostras, foram realizadas utilizando o *kit* Universal cDNA *Synthesis kit II Exiqon* (Vedbaek, Dinamarca). Esta reação foi conduzida em um termociclador com 1 ciclo de 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 95°C e em seguida, os cDNA foram estocados à -20°C.

3.6.4 Expressão dos miRNAs por RT-PCR

Placas comerciais de 96 *wells* foram utilizadas para *screening* dos miRNAs da cana de açúcar (*Pick-&-mix microrna pcr panel, 96 well ready-to-use (mi), vii7, Exiqon, Vedbaek, Dinamarca*). Para este ensaio foram utilizados a seleção prévia dos 25 miRNAs no banco de dados mirbase. Estes miRNAs da cana de açúcar foram distribuídos em triplicata e hibridizados nos poços da placa de 96, bem como os controles do fabricante, demonstrado na figura 5.

Figura 5: Esquema de distribuição dos miRNAs da cana de açúcar nas placas comerciais (*Pick-&-mix microrna pcr panel, 96 well ready-to-use (mi), vii7, Exiqon, Vedbaek, Dinamarca*) para o Screening, RT-PCR e análise dos miRNAs.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pta-miR106a	pta-miR106a	pta-miR106a	ssp-miR528	ssp-miR528	ssp-miR528	sof-miR306	sof-miR306	sof-miR306	ssp-miR437c	ssp-miR437c	ssp-miR437c
B	sof-miR150	sof-miR150	sof-miR150	ssp-miR827	ssp-miR827	ssp-miR827	sof-miR408a	sof-miR408a	sof-miR408a	ssp-miR444a	ssp-miR444a	ssp-miR444a
C	ssp-miR159a	ssp-miR159a	ssp-miR159a	sof-miR159a	sof-miR159a	sof-miR159a	sof-miR408e	sof-miR408e	sof-miR408e	ssp-miR150	ssp-miR150	ssp-miR150
D	ssp-miR167b	ssp-miR167b	ssp-miR167b	sof-miR150c	sof-miR150c	sof-miR150c	ssp-miR1128	ssp-miR1128	ssp-miR1128	ssp-miR168a	ssp-miR168a	ssp-miR168a
E	sof-miR150e	sof-miR150e	sof-miR150e	ssp-miR1432	ssp-miR1432	ssp-miR1432	ssp-miR444b.1	ssp-miR444b.1	ssp-miR444b.1	ssp-miR437a	ssp-miR437a	ssp-miR437a
F	sof-miR167a	sof-miR167a	sof-miR167a	ssp-miR169	ssp-miR169	ssp-miR169	ssp-miR437b	ssp-miR437b	ssp-miR437b	ssp-miR444c-3p	ssp-miR444c-3p	ssp-miR444c-3p
G	sof-miR168b	sof-miR168b	sof-miR168b									
H	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp8 CP	UniSp3 IPC	UniSp3 IPC	UniSp3 IPC

Reações foram preparadas contendo um *mix* de cDNA, *Sybr®Green Master mix* e água. Para cada amostra foi realizada uma triplicata, possibilitando o rastreamento dos principais miRNAs da cana de açúcar conhecidos. Posteriormente, foram realizadas no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, localizado no campus de Araraquara/SP as reação de RT-PCR utilizando o equipamento *Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)*, constituído o ensaio de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido por 45 ciclos de amplificação de 10 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Todas essas especificações foram seguidas conforme o guia do fabricante *Exiqon®* para estudos de miRNAs e os ensaios para cada amostra foram realizados em triplicata técnica.

3.6.5 Análise de Dados e Bioinformática - miRNAs

Diante dos dados processados pelas reações de RT-PCR, análises foram realizadas através de ferramentas de bioinformática para determinar os miRNAs diferencialmente expressos, bem como suas identificações e funções, possibilitando assim uma possível interação (miRNA cana de açúcar vs levedura) e possíveis descobertas de futuros alvos para descontaminação de dornas de fermentação. Diferentes análises comparativas foram

realizadas entre os miRNAs da cana de açúcar isolado (controle) e os tempos de 0h e tempo 8h.

Inicialmente, os dados foram processados pelo *Software DataAssist*TM v 3.01 (*Applied Biosystems*), projetado para realizar quantificação relativa utilizando o método comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$). Para tanto, os níveis de miRNAs foram normalizados aos níveis dos controles endógenos (UniSp6PC) e controle padrão da reação (UniSp3IPC).

De acordo com os dados obtidos, foram determinados os miRNAs diferencialmente expressos, considerando como critério biológico um valor de $p < 0,05$. Posteriormente, os mesmos foram filtrados e caracterizados como induzidos ou reprimidos em função do algoritmo *Fold Change* (RQ) normalizado, este pela quantificação relativa da expressão do miRNA na amostra teste em relação ao controle, visto que o valor do controle ajustado para 1.

3.6.5.1 Identificação Funcional dos miRNAs

A partir da identificação dos miRNAs diferencialmente expressos, análises de identificação de função dos mesmos foram realizadas utilizando o *programa psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server* (disponível em <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>).

3.6.5.2 Análise Interação miRNA-Gene/Alvo

Em vista disso, análises dos genes-alvos validados, regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos, foram realizadas utilizando o *software RNA 22* (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>), uma ferramenta computacional que identifica possíveis alvos preditos na interação miRNA-gene, através de alinhamento gênico canônico.

3.6.5.3 Rede de Interação miRNA- Gene/Alvo

Redes de interação entre os miRNAs e seus genes-alvo foram construídas utilizando o *software Navigator v2.2* (*Network Analysis, Visualization, & Graphing Toronto*).

3.6.5.4 Alinhamento Gênico de *Candida tropicalis* e micro-organismos contaminantes e não-contaminantes

Afim de encontrar alinhamentos quase perfeitos dos miRNAs diferencialmente expressos com as amostras de *C. tropicalis* e também de outras espécies de micro-organismos que possam ser contaminantes de um processo fermentativo, visando a interação RNAi levedura, foram realizados um *Blast* através da ferramenta *Blast online* (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Essa ferramenta possibilita regiões gênicas similares entre sequência biológicas, através de um banco de dados. Para estas análises foram utilizados a sequência gênicas dos genes-alvos regulados pelo miRNA.

4.RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Fermentação Alcólica

4.1.1 Escalonamento Celular

Para a concentração final de biomassa necessária para cada ciclo de fermentação posterior, foram realizados quatro ensaios de escalonamento celular. Este resultado foi em virtude de que, para cada ensaio, foram obtidos em média de 13,2 g/mL de biomassa de levedura C4 e 15 g/mL de biomassa da levedura PE-2, sendo necessário para uma concentração final na fermentação, 20 g/mL de cada levedura, equivalente a 10% de massa seca, comparando as condições padrões das usinas brasileiras. Então, ao final dos três ciclos independentes com duas replicatas biológicas, foram realizados para cada levedura (C4 e PE-2) um total de doze ciclos de escalonamento celular.

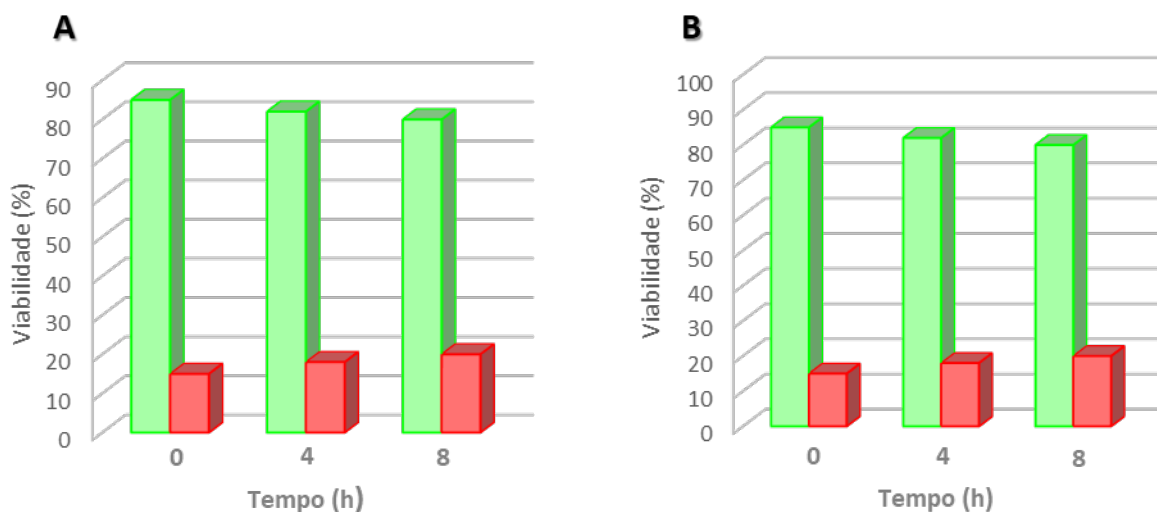
4.1.2 Ciclos de Fermentação Alcólica

Foram realizados seis ciclos de fermentação alcólica de 8 horas, onde foram retirados cerca de 5 mL de cada hora (0h, 1h, 2h, 3h,4h, 5h, 6h, 7h e 8h) de cada ciclo de levedura (C4 e PE-2) para as análises posteriores de capacidade fermentativa, transcriptoma e miRNAs.

4.1.3 Viabilidade Celular (*Live/Dead – Yeast*[®])

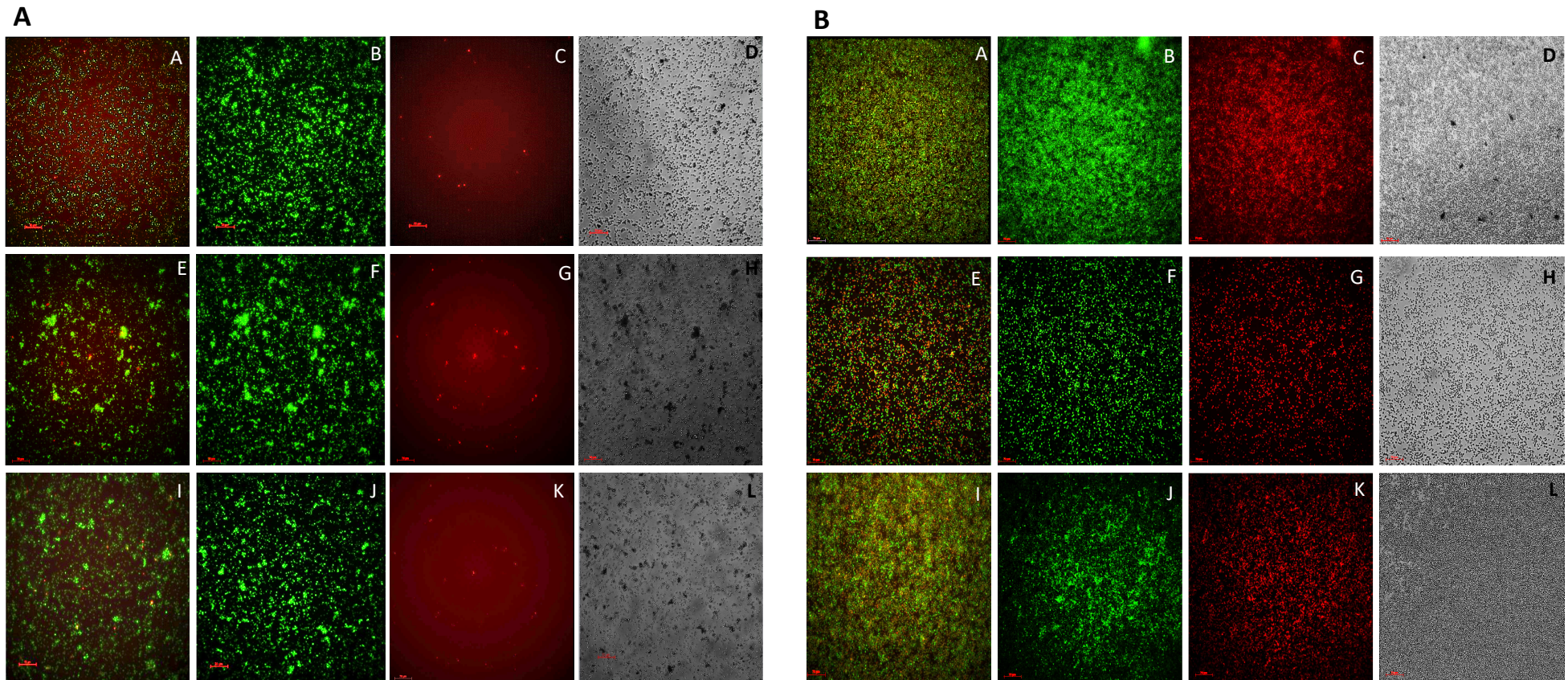
Como resultado para linhagem contaminante *C. tropicalis* (C4), nos tempos de 0, 4 e 8 horas, foi verificado que através das imagens obtidas pelo *IN Cell Analyzer* possibilitam a visualização das células, que em sua maioria encontram-se coradas de verde em função da atividade de esterases intracelulares e com membrana íntegra para todas representando uma alta viabilidade nos tempos determinados 0h (97%), 4h (95%) e 8h (94%), representados na figura 6A. Estes dados também foram observados nos resultados da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), onde assim como a contaminante apresentou uma alta viabilidade nos mesmos tempos determinados, 0h (85%), 4h (83%) e 8h (81%), representados na figura 6B.

Figura 6: Ensaio de Viabilidade Celular – *Live/Dead*[®]. **(A)** Porcentagem de viabilidade das células da linhagem contaminante *Candida tropicalis* (C4), nos tempos de 0h, 4h e 8h. **(B)** Porcentagem de viabilidade das células da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), nos tempos de 0h, 4h e 8h. Análises conduzidas pelo software *In Cell Investigator 1000 Workstation*. Barras em coloração verde, expressam viabilidade positiva (células vivas); Barras de coloração vermelha, expressam viabilidade negativa (células mortas).



Esses resultados podem ser confirmados para ambas as linhagens a partir da análise de fluorescência realizada pelo software *Investigator 1000 Workstation*, que demonstra em todos os tempos testados para as duas linhagens, apresentou uma viabilidade celular superior a 80%. As imagens adquiridas pelo aparelho *In Cell Analyser* representado a viabilidade podem ser visualizadas nas figuras 7A para *C. tropicalis* (C4) e 7B para *S. cerevisiae* (PE-2). Mesmo com um número um pouco reduzido de viabilidade da linhagem de *S. cerevisiae* (PE-2), esses dados não apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos selecionados.

Figura 7: Viabilidade Celular – *In Cell Analyser*, objetiva de 20x: **(A)** Imagens da linhagem contaminante *Candida tropicalis* (C4): **(A-D) tempo de 0h:** **(A)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(B)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(C)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(D)** células sem marcação em campo claro. **(E-H) tempo de 4h:** **(E)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(F)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(G)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(H)** células sem marcação em campo claro. **(I-L) tempo de 8 horas:** **(I)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(J)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(K)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(L)** células sem marcação em campo claro. **(B)** Imagens da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2): **(A-D) tempo de 0h:** **(A)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(B)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(C)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(D)** células sem marcação em campo claro. **(E-H) tempo de 4h:** **(E)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(F)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(G)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(H)** células sem marcação em campo claro. **(I-L) tempo de 8 horas:** **(I)** células marcadas com fluorocromos calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1); **(J)** células marcadas com somente com fluorocromo calcéina AM; **(K)** células marcadas com somente com fluorocromo homodímero de etídio (EthD-1) e **(L)** células sem marcação em campo claro.



Portanto, com esses resultados foram visualizado que a linhagem contaminante de *C. tropicalis* possui tanto uma excelente viabilidade como também resistência para todo um ciclo de 8 horas de fermentação. Essa resistência da *C. tropicalis* pode ser devida a sua resistência natural a condições adversas e principalmente a atividade de antifúngicos. Inúmeros trabalhos como os de Zhang et al, 2008, Brandão et al, 2010 e Rajkowska et al, 2017, relatam e estudam os mecanismos de resistência da *C. tropicalis*. Essa teoria pode ser comprovada com nossos resultados, pois mesmo em condições adversas como redução de nutrientes, elevação de temperatura e concentração de bioetanol, a linhagem de *C. tropicalis* (C4) mostrou uma viabilidade de 94% ao fim de uma fermentação de 8 horas (Zhang et al, 2008, Brandão et al, 2010 e Rajkowska et al, 2017).

4.1.4 Atividade Metabólica

Considerando um ciclo de fermentação de 8 horas, foi observado para ambas as linhagens de leveduras, uma atividade metabólica ativa nos tempos determinados. Esses tempos foram escolhidos, pois em 4 horas seria o ponto total de crescimento da levedura para começar a produção de etanol, bem como, no ponto de 8 horas é considerado um ponto de declínio ou morte, visto que com esse tempo a concentração de açúcar diminui e a concentração de etanol aumenta, onde algumas leveduras não conseguem sobreviver. Diante de nossos resultados, foi observado que esse perfil se encaixa na levedura padrão de *S. cerevisiae* (PE-2), como esperado, mas o interessante, foi verificar que a levedura contaminante *C. tropicalis* também apresentou o mesmo perfil de atividade, mostrando que ela caminha juntamente com a levedura padrão metabolicamente numa cinética de atividade como mostrado na figura 8. Com esse resultado, não houve diferença estatística entre as amostras.

Figura 8: Concentração da atividade metabólica das linhagens de leveduras *Candida tropicalis* (C4) e *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) pelo ensaio de XTT + menadiona em meio RPMI - 1640 suplementado com 2% glicose e tamponado com MOPS, nos períodos de 0h, 4h e 8 horas durante ciclo de fermentação alcoólica. Estaística Two-way ANOVA, pos teste Bonferroni, $p < 0,05$.

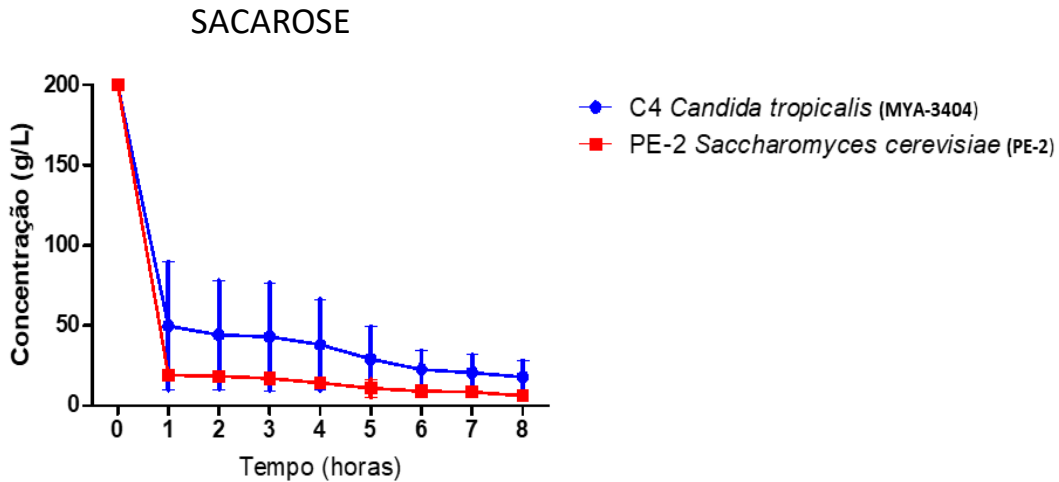
(MYA-3404)

(PE-2)

4.1.5 Assimilação de Açúcares e Produção de Bioetanol

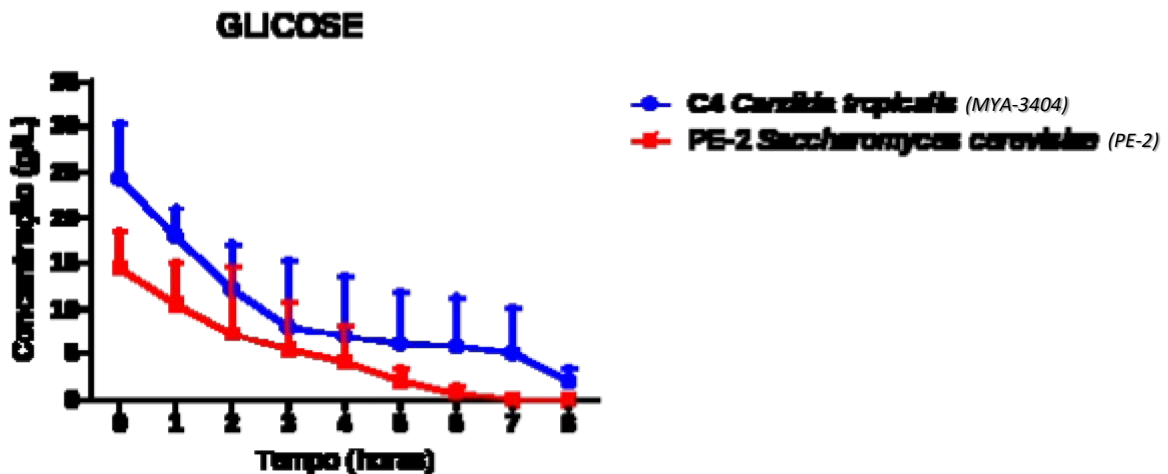
Para os níveis de concentração de sacarose, o resultado foi que a levedura padrão *S. cerevisiae* assimilou cerca de 98% (195,15 g/L) do total de sacarose do meio. Com a levedura contaminante *C. tropicalis* essa concentração foi menor, visto que essa levedura assimilou cerca de 91% (182,05 g/L), mostrado na figura 9. Por mais que quanticamente esses resultados tenham sido diferentes, se observarmos o perfil de assimilação em horas esse resultado é semelhante, pois as duas possuem um pico e um declínio em 4 e 8 horas respectivamente. O interessante foi verificar que, a levedura contaminante possui um poder de assimilação grande como já esperado pelo seu perfil bioquímico, ainda mais frente a um meio rico como o caldo de cana. O que a torna a levedura *C. tropicalis* um problema de contaminação é que assim como a *S. cerevisiae* ela é uma espécie de *Candida* que consegue assimilar sacarose, como é mostrado em alguns estudos como Basso et al. 2008. Essa assimilação em um processo fermentativo pode chegar a ser até 40% da sacarose disponível no meio, causando então a perda de nutrientes para as leveduras padrões. (Basso et al, 2008). A estatística dos nossos resultados não mostrou diferença significativa entre as amostras analisadas.

Figura 9: Cinética de assimilação de sacarose por ensaio de HPLC, das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Candida tropicalis* (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas. Estatística Two-way ANOVA, pos teste Bonferroni, $p < 0,05$.



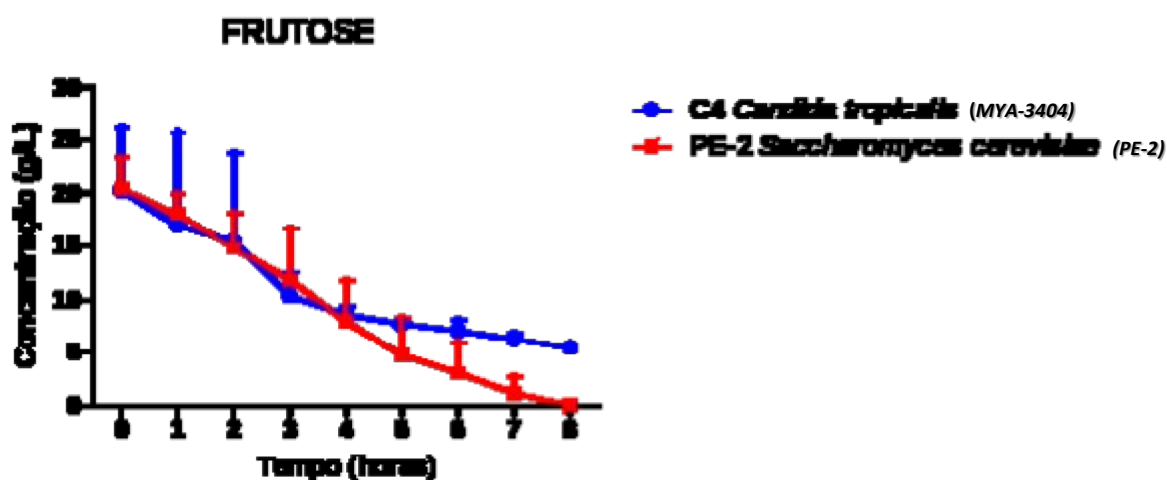
Os resultados para a assimilação de glicose também foram com perfis parecidos, sendo que para glicose a levedura padrão *S. cerevisiae* (PE-2) foi assimilado 100% e a levedura contaminante *C. tropicalis* (C4) assimilado 81,66% como mostrado na figura 10. Mesmo a levedura *C. tropicalis* assimilando uma quantidade de glicose alta, pareando seu perfil novamente com a levedura padrão, o metabolismo da *S. cerevisiae* é visivelmente mais rápido, visto que em 6 horas não havia existência de concentração de glicose, em contrapartida a levedura *C. tropicalis* em 8 horas, apresentava uma pequena quantidade de glicose residual.

Figura 10: Cinética de assimilação de glicose por ensaio de HPLC, das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Candida tropicalis* (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas. Estatística Two-way ANOVA, pos teste Bonferroni, $p < 0,05$.



Esse resultado também foi verificado para o consumo de frutose, em *S. cerevisiae* esse consumo foi de 100% em 7 horas. Em *C. tropicalis* em 8 horas ainda existia um residual de cerca de 6 g/L ainda no meio, como mostrado na figura 11. A estatística não mostrou diferença entre as amostras analisadas.

Figura 11: Cinética de assimilação de frutose por ensaio de HPLC, das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Candida tropicalis* (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas. Estaística Two-way ANOVA, pos teste Bonferroni, $p < 0,05$.



Esse comportamento de assimilação de açúcares em leveduras, é verificado em muitos estudos através da ação e metabolismo das conhecidas enzimas invertases, auxiliaadoras na assimilação de açúcares, principalmente em *S. cerevisiae* como mostra o estudo de Basso et al, 2011. Em *C. tropicalis* essas enzimas também são encontradas com estudo de Alekseeva et al, 2014. Mesmo contendo enzimas nas duas linhagens, o metabolismo da *S. cerevisiae* é bem mais rápido e eficiente, visto pelos nossos resultados, onde em concentração de glicose e frutose a assimilação foi 100%.

Uma das hipóteses para essa assimilação menos eficiente da *C. tropicalis* quando comparada com a *S. cerevisiae*, seria que em espécies de *Candida* essas enzimas sejam mais glicosiladas e ancoradas a parede fúngica, não tendo ação extracelular, diferente da *S. cerevisiae* que estudos apontam um dinamismo no metabolismo entre intracelular e extracelular, sendo o último o mais predominante (Basso et al, 2011; Alekseeva et al, 2014).

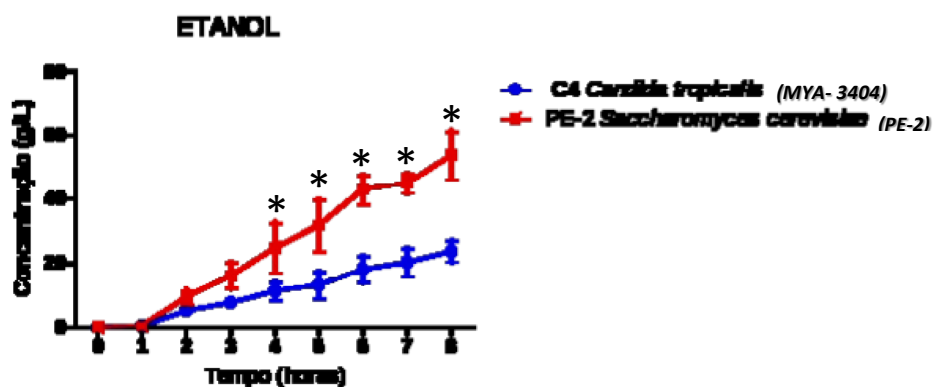
Com isso, a captação e metabolismo da glicose e frutose através da quebra da sacarose em *S. cerevisiae* ser mais eficiente e em *C. tropicalis* mais comprometido. Outro ponto chave seria a ação dos genes SUC2, que em *S. cerevisiae* ser mais ativo, permite a assimilação de alguns tipos de isoformas de invertase extra e intracelular, onde em espécies de *Candida*, esse gene até é encontrado, mas com uma atividade reduzida, (Chávez et al, 1998; Basso et al, 2011).

Observando nossos resultados, podemos ver que a *C. tropicalis* possui um amplo poder de recrutar enzimas, quebrar e assimilar moléculas de dissacarídeos e monossacarídeos de açúcares, utilizando essa como uma fonte de nitrogênio para seu crescimento e sobrevivência durante um período de 8 horas de fermentação. Ao final esses resultados de assimilação corroboram com os resultados observados na viabilidade celular.

Quando foi observado os resultados para produção de etanol, foi possível verificar que a levedura *S. cerevisiae* possuiu uma maior produção com cerca de 50 g/L comparado com a levedura contaminante *C. tropicalis* com cerca de 24 g/L, como mostra a figura 12.

Essa diferença pode ser comprovada pela significância estatística apresentada, onde no tempo de 4 horas, meio de um ciclo fermentativo e momento em que a levedura começa a ficar metabolicamente mais ativa para a produção do etanol, o contaminante *C. tropicalis* apresentou um comportamento lento. Esse perfil se manter até o tempo de 8 horas, onde através da figura é observado a potencial produção de *S. cerevisiae* e a media produção de *C. tropicalis*.

Figura 12: Cinética de produção de etanol, em quantificações por ensaio de HPLC, das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Candida tropicalis* (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h,7h e 8 horas. Estaística Two-way ANOVA, pos teste Bonferroni, $p < 0,05$.



Com estes dados podemos verificar que a *C. tropicalis* além de assimilar açúcares complexos, também tem a capacidade de produção de etanol, essas concentrações relativamente menores quando comparado a uma levedura padrão, mas ainda assim produtora.

Essa característica da *C. tropicalis* já é bem referendada em estudos que mostram seu perfil de fermentação na utilização de bioetanol de segunda geração, através da quebra da xilose, por apresentarem um sistema com xilose redutase dependente de NADPH e enzimas de xilitol desidrogenase dependentes de NAD (Eryasar et al, 2016). A xilose por ser um monossacarídeo, diferente da sacarose que é um dissacarídeo, é uma molécula de mais fácil quebra para a levedura, fazendo com que sua assimilação e captação sejam maiores.

Uma outra característica que foram observadas em todos esses resultados de capacidade fermentativa foi a resistência da levedura contaminante *C. tropicalis*, pois em todos os ensaios os ensaios até o ponto final de 8 horas ela foi ativa, até mesmo no ensaio de produção de etanol, quando apresentou uma concentração de bioetanol relativamente alta para sua integridade. Esses dados de resistência da *C. tropicalis* em fermentação já foram estudados, como mostra o estudo de Choudhary et al, 2017, mostrando que esta espécie de leveduras tem sido cada vez mais utilizadas em processo de sacarificação simultânea para produção de bioetanol (Choudhary et al, 2017).

Todos esses resultados vêm corroborando entre si para mostrar como a *C. tropicalis* é um contaminante potencial nas usinas brasileiras, desde sua morfologia, seguindo a atividade metabólica, ela ativa até o tempo final de 8 horas, mostrando a presença de assimilação de açúcares e produção de etanol durante todo esse período de ciclo, fechando e comprovando esses dados com a viabilidade celular, que em 8 horas apresentou 96% de suas células viáveis.

4.2 Extração de RNA das amostras de contaminante *Candida tropicalis* (C4) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2)

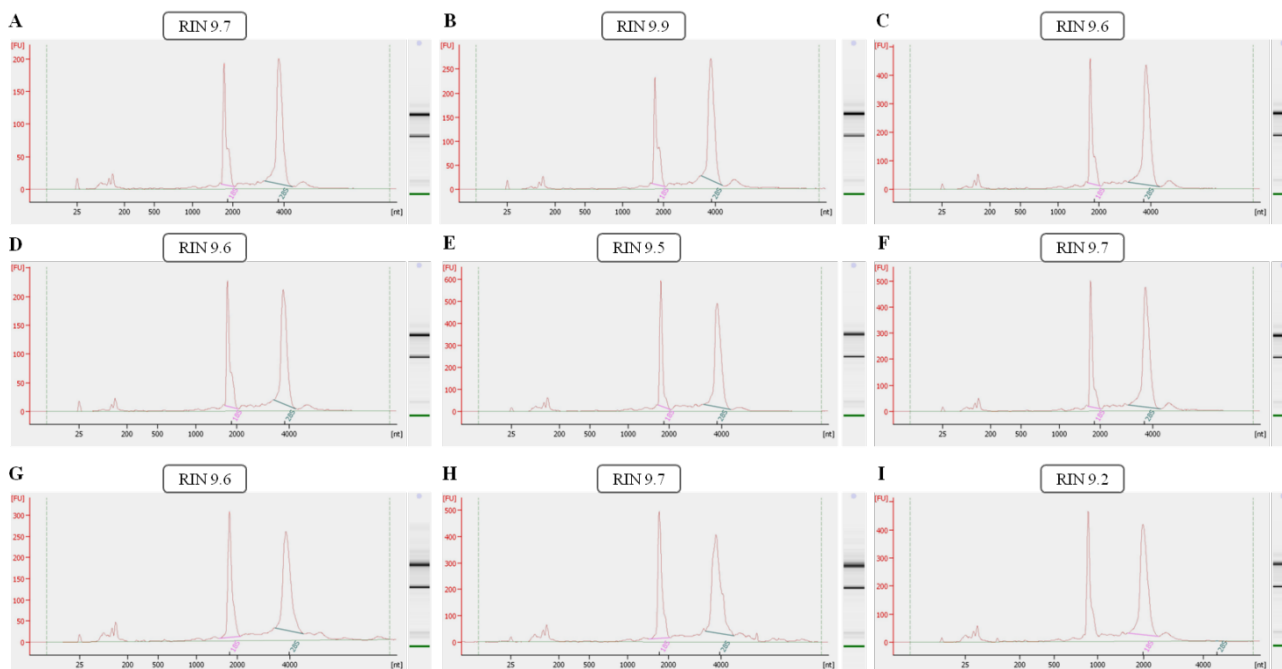
Para as extrações das amostras de caldo de cana de açúcar, levedura contaminante *C. tropicalis* (C4) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) para os micro-organismos os tempos de 0 e 8 horas, foram obtidos as seguintes concentrações, mostradas na tabela 2.

Tabela 2: Quantificações e purezas das extrações de RNA das amostras do caldo de cana de açúcar (CC), contaminante *C. tropicalis* (C4) nos tempos de 0 e 8 horas (C0 e C8) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), nos tempos de 0h, 4h e 8h (P0 e P8), obtidas pelo aparelho *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers*.

Extração RNA		
	[] RNA ng/μL	260/280
CC	273,71	2.3
C0	1751,90	2.1
C8	1211,45	2.1
P0	1321,05	2.1
P8	1152,75	2.1
C0	640,76	2.3
C8	614,51	2.1
P0	715,60	2.1
P8	741,52	2.3

Na extração de RNA foi verificado que todas as amostras (CC, C0, C8, P0 e P8 e suas réplicas) mostraram uma concentração > 250 ng/μL, ideal para as etapas posteriores. Foi também avaliada a integridade das amostras por análise eletrofororética capilar no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer®* e RIN – *RNA Integrity Number* com valores para todas as amostras maiores que 9, como mostrado na figura 13.

Figura 13: Eletroferograma das amostras mostrando qualitativamente e quantitativamente a Integridade de RNA: **(A)** Caldo de Cana de Açúcar- CC; **(B-C)** contaminante *Candida tropicalis* (C4): **(B)** C0 - tempo de 0 hora; **(C)** C8- tempo de 8 horas; **(D-E)** levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2): **(D)** P0- tempo 0 hora; **(E)** P8- tempo 8 horas; **(F-G)** réplicas do contaminante *Candida tropicalis*: **(F)** C0 - tempo de 0 hora; **(G)** C8- tempo de 8 horas; **(H-I)** réplicas levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2): **(H)** P0- tempo 0 hora; **(I)** P8- tempo 8 horas; Análises realizadas por técnica de eletroforese capilar no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*® e valores de RIN – *RNA Integrity Number*.



As extrações do contaminante *C. tropicalis* (C0 e C8) foram utilizadas para os ensaios de transcriptoma e miRNAs. As extrações das amostras da levedura *S. cerevisiae* foram utilizadas somente para os ensaios de miRNAs.

4.3 Transcriptoma

4.3.1 Dados de Sequenciamento e Mapeamento sobre o Genoma de *Candida tropicalis*

O mapeamento produziu cerca de 96% da taxa de alinhamento geral com o genoma de referência de *C. tropicalis*, nas duas amostras, sendo as réplicas biológicas C0 e C0, bem como C8 e C8. Um total de 22 genes foi excluído para análise posterior, uma vez que não tinham leituras mapeadas.

4.3.2 Análise Diferencial da Expressão Gênica das amostras de *Candida tropicalis*

Um total de 949 genes diferencialmente expressos (DEGs) foi obtido, 506 para regulação induzida e 443 para regulação reprimida.

Para melhor elucidação dos mecanismos que o contaminante *C. tropicalis* utiliza durante todo o processo de fermentação, os 100 principais genes (tanto para induzidos como para reprimidos) foram analisados e como resultados foi observado um gama de genes ligados a fatores essenciais da fermentação, como: álcool desidrogenase, glicólise/gliconeogênese, transporte de açúcar, piruvato carboxilase, genes de resistência, meiose, metabolismo, função estrutural, função nuclear e transcrição. Curiosamente, uma grande quantidade de genes de fatores como transporte de açúcares, membrana, metabolismo de aminoácidos relacionados a crescimento, glicose e gliconeogênese, meiose apresentou regulação reprimida, enquanto os regulados acima são geralmente relacionados à função nuclear e à transcrição, como mostrado na tabela 3.

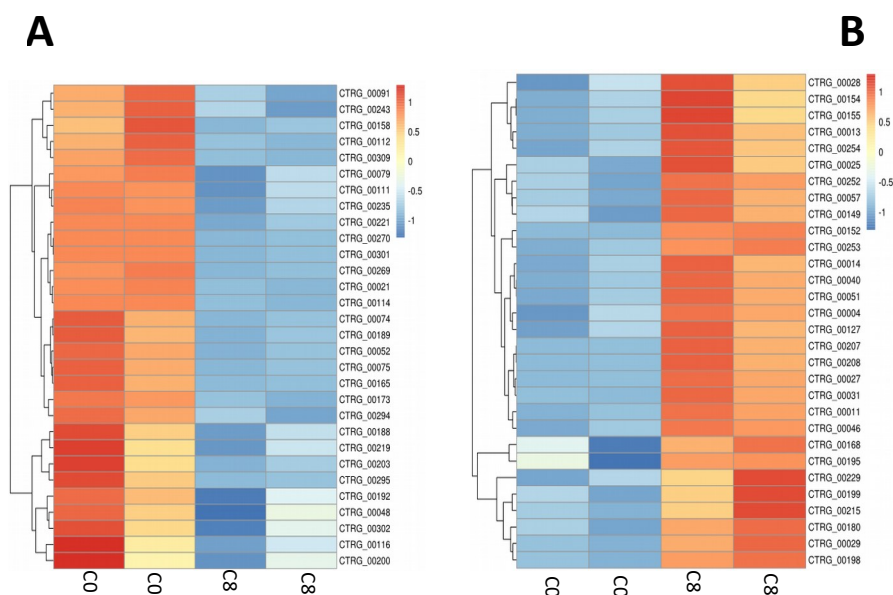
Tabela 3: Quantificação e dos top 100 genes selecionados para reprimidos e induzidos e suas classificações funcionais referentes ao processo de fermentação alcoólica das amostras C0 / C0 e C8 / C8 com valor de *fold change* > 2 e < -2, bem como p-valor de < 0,01.

Fatores de Fermentação	Reprimidos	Induzidos
Enzima Álcool Desidrogenase	7	-
Transporte de Açúcares	9	6
Piruvato Descarboxilase/ Enzima Acetil CoA	5	1
Histonas	4	1
Metabolismo de Aminoácidos	15	17
Meiose	1	1
Membrana	10	10
Transporte de Metais	3	2
Resistência e Estresse Oxidativo	7	6
Gliconeogênese e Glicólise	8	5
Fatores Nucleares e Transcrição	9	19
Estrutura de Plantas	3	-
Nucleotídeos	-	5
Função Hipotética	19	27

Estes resultados também podem ser visualizados no nível de expressão em cada amostra (Figura 14 A e B), que uma expressão da atividade do gene em condição reprimida mostra uma maior expressão gênica nas amostras de tempo 0h (C0 e C0), com genes relacionados a (CTRG_00021 , 00141, 00079, 00221 e 00294), atividade mitocondrial (CRTG_00165, 00269, 00270 e 00309), citoesqueleto (CRTG_00235), metabolismo de aminoácidos (CTRG_00112) e ligado às enzimas relacionadas ao início da fermentação (CTRG_00301). Assim, podemos sugerir que, às 0h, a levedura expressa mais genes relacionados à formação de ATP, energia, ciclo celular de modo a prezar pelo crescimento durante as primeiras horas e assim ao longo do tempo se tornando ativa para

produção de bioetanol bem como, se adaptar a todas as vias desfavoráveis durante o processo de fermentação. Por outro lado, a condição induzida, as amostras de 8h (C8 e C8) (Figura 1B) foram relacionadas ao metabolismo de amônio (CTRG_00229, 00199, 00031, 00152, 00040, 00051, 00127, 00013, 00254 e 00127) e (CTRG_00028, 00252, 00025 e 00253) e fatores de transcrição (CTRG_00025, 00253, 000252) estão presentes, podendo mostrar uma maior atividade metabólica nesta levedura, além de resistência e manutenção de viabilidade, corroborando com os dados da capacidade fermentativa e com a dinâmica de produção de bioetanol, que geralmente está entre 6 e 8 horas.

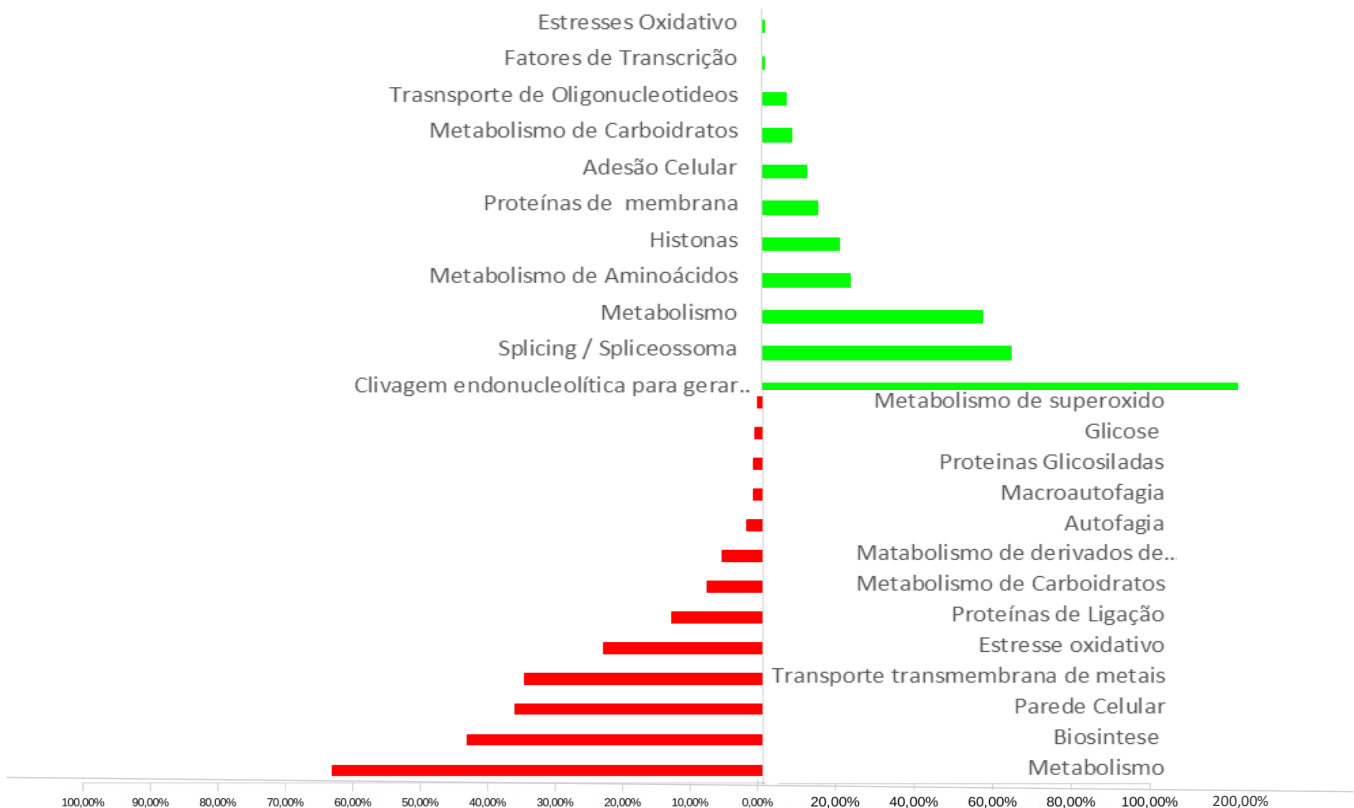
Figura 14: *Heatmap* dos 30 principais genes diferencialmente expressos: **(A)** genes reprimidos para 8 horas (C8 e C8) em contraste com 0 horas (C0 e C0); **(B)** genes induzidos para 8 horas (C8 e C8) em contraste com 0 horas (C0 e C0). Genes com \log^2 *Fold Change* > 2 ou < -2 e p-value < 0,01 foram considerados diferencialmente expressos com diferenças estatisticamente significativas. Os valores de *Heatmap* são normalizados com rlog e dimensionados por z-score. As escalas de cores no canto superior direito são de azul, expressão inferior, até expressão vermelha, maior.



4.3.4 Análise e Enriquecimento das amostras de *Candida tropicalis* - GOs

Os resultados da análise GOs concordam com DEGs, mostrando para os genes reprimidos possuíram uma alta representatividade de processos biológicos relacionados ao processo celular, metabolismo de transferases e fosfolipases, membranas de parede / célula ligados a enzimas invertases, bem como metabolismo energético e produção de ATP. Os genes induzidos são representados por processos biológicos relacionados à transcrição, *splicing*, resposta ao estresse e estresse oxidativo (Figura 15).

Figura 15: Quantificação do processo biológico de genes regulados para cima e para baixo. (A) Representação de processos biológicos em genes regulados para baixo a 8 horas (C8 e P8) em contraste com 0 horas (C0 e P0); (B) Representação de processos biológicos em genes regulados superiores a 8 horas (C8 e P8) em contraste com 0 horas (C0 e P0).



O processo de produção de bioetanol conta com várias etapas até a formação final do bioetanol, visando o passo mais importante a capacidade do micro-organismo de consumir todos os componentes expostos a ele e realizar as reações bioquímicas de uma forma dinâmica e coordenada. Se todas estas etapas ocorrem de forma absoluta e coordenada, a produção é considerada promissora, mas a presença de contaminantes é um problema que ocorre nas indústrias brasileiras afetando diretamente a produtividade (Amorin et al, 2011).

As semelhanças entre essas duas linhagens de leveduras vão além da caracterização fenotípica ou perfil fermentativo, mas também em perfil transcricional, onde são observadas expressões gênicas de *C. tropicalis* diretamente ligadas a estudos com expressões de *S. cerevisiae*. Como *C. tropicalis* é um eucarioto, funções essenciais nucleares e citoplasmáticas foram observadas. O que nos atenta são os processos

essenciais que em estudos de fermentação são essenciais para a *S. cerevisiae* e foram observados nas nossas amostras de *C. tropicalis*.

Metabolismo de aminoácidos é essencial nas células eucariotas, pois regulam diretamente o metabolismo do açúcar (ATP), ao observar nossos resultados vimos que no tanto no tempo de 0 hora quanto no tempo de 8 horas a assimilação dessas fontes para o metabolismo de aminoácidos está presente, mostrando que nossa levedura mesmo não sendo a padrão *Saccharomyces cerevisiae*, possui comportamento similar na cinética de fermentação.

Esses dados são confirmados, através do estudo de Jiranek et al, 1995 e Albergaria et al 2016, mostrando que são crescentes o número de leveduras não-*Saccharomyces* utilizadas em processos de fermentação que possuem alta capacidade de assimilar fontes de nitrogênio e as transformar em condições vitais, lembrando que a demanda para essas fontes vem diretamente do teor de açúcar utilizado no começo da fermentação, dependendo somente do metabolismo da levedura e das condições da fermentação para o aproveitamento dessas fontes.

Na fermentação, uma fonte de nitrogênio é utilizada, essencial tanto no crescimento quanto no metabolismo da levedura durante todo o processo fermentativo (Gobert, 2017), onde em muitos casos a deficiência dessa fonte é revertida na perda de biomassa, viabilidade e diminuição do metabolismo de fermentação da levedura (Hazelwood, 2008).

Dentre todas as fontes de nitrogênio assimiladas na fermentação estão a arginina, valina, asparagina, amônia, alanina, glutamina entre outros, onde estudos mostram que na espécie *S. cerevisiae* a fonte preferida é a amônia, está presente no meio (Kemsawasd et al, 2015).

O mecanismo de assimilação dessas fontes em leveduras *Saccharomyces* são bem conhecidos, como estudo de Magasanik et al 2002, que aponta que fontes preferidas de nitrogênio expressam permeases de assimilação, enquanto que fontes secundárias são reprimidas e degradadas através de um sistema controle de repressão de catabólitos de nitrogênio (NCR), resultando na boa performance da fermentação. Mas em contrapartida esses mecanismos não são bem elucidados em espécies não-*Saccharomyces*, mesmo sabendo que estudos já mostram que a assimilação em meio fermentativo pode ser igual a leveduras padrões, como vimos em nossos resultados com *C. tropicalis* (Jolly et al 2014).

Muitas enzimas mitocôndrias ligadas a biossíntese de aminoácidos foram observadas na expressão de *C. tropicalis*, evidenciando o potencial dessa levedura para fermentação. Essas proteínas internalizadas dentro das mitocôndrias estão envolvidas no transporte de elétrons e formação de ATP, através da redução de NADH e NADPH, passos essenciais na etapa de fermentação (Kadhar et al, 2017). Em *Saccharomyces cerevisiae* as mitocôndrias começam essa biossíntese através do metabolismo de alguns aminoácidos, como arginina e prolina (Brandriss et al, 1992).

De todas as enzimas importantes na biossíntese desses aminoácidos, duas foram destacadas em nossos resultados, a delta-1-prolina-5-carboxilase redutase e a delta-1-prolina-5-desidrogenase, mostrando a importância da prolina no metabolismo da levedura *C. tropicalis*. A prolina por sua vez, é uma rica fonte de nitrogênio que quando ativada é convertida a glutamato, uma etapa funcional importante na cadeia de elétrons, sendo o passo final da biossíntese da prolina, a geração de NADP⁺ (Takagi, 2008).

A biossíntese do ácido lipóico também foi observada em nossos resultados, principalmente no tempo de 0 hora, mostrando que a célula nesse tempo utiliza de todos os mecanismos possíveis para formação de energia, para poder realizar seu papel na fermentação. O ácido lipóico além de ser um neutralizar de radicais livres, também está associado à produção de energia (Kursu et al, 2013).

Em *Saccharomyces cerevisiae* como mostra estudos de Schnauer et al, 2009, o ácido lipóico está ligado a reações de descarboxilação oxidativa, através um complexo multi-enzimas, que atua diretamente na atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) e alfa-ketoglutarato desidrogenase (KDH), ligadas a formação de energia celular. (Schnauer et al, 2009).

Atividade do citocromo C oxidase foi observada em 0 horas para formação de ATP, visto que essa enzima é derivada de um complexo transmembranar, componente essencial na cadeia de elétrons (Mc Clelland et al, 2014; Zhao et al, 2018). Localizada na parte interna da mitocôndria tem papel fundamental na cadeia respiratória, além de ser um ativador de via intrínseca para apoptose. Em eucariotos é ligado a via COX, para formação de ATP (Garcia-Villegas et al 2017).

Uma proteína de membrana integral pertencente à família de transdutores de fosfato, a PHO89, também foi expressa com certa significância no tempo de 0 hora, isso mostra que mais uma vez a levedura está usando de todos os mecanismos viáveis para

geração de energia, se assemelhando a muito o comportamento visto já em leveduras padrões de *S. cerevisiae*.

Essa proteína possui características interessantes em eucariotos, onde é induzida por condições de estresse por Ca^{2+} , normalização da homeostase celular e também como indicadores de pH do meio fermentativo. Em *Saccharomyces cerevisiae* é observada a respostas adaptativas de estresse pela ativação de sinalizadores e via da calcineurina. Uma das condições mais observadas é a alcalinização do meio possuindo impacto negativo para absorção de metais bem como para glicose (Árino, 2010).

Em *Candida albicans*, é também observada para mudanças em condições de pH, possuindo efeito na morfogênese e patogenicidade, mostrando que a questão ambiental para os eucariotos é de fundamental importância para o bem estar celular (Wang et al, 2011).

A F-actina também foi muito observada na expressão dos nossos resultados, ligada diretamente a endocitose, mecanismo fundamental em eucariotos (Wang et al, 2017). A actina desenha um papel na estrutura celular com crescimento de parede e correlação com crescimento ativo na ponta dos brotos em leveduras de espécie *Saccharomyces ssp* e *Candida sp*, além de possuir atividade de manutenção da polaridade e resistência a forças osmóticas (Suzuki et al, 1998).

Em leveduras fermentadoras, a presença de filamentos de actina são visto através das fusões da membrana vacuolar, medidas por duas RhoGtpases: Rho1p e Cdc42p, favorecendo assim o crescimento celular e a osmolaridade da célula durante o processo de fermentação (Bodmam et al, 2015).

Algumas permeases e fosfases de forma geral também foram visualizadas em nossos resultados tanto para o tempo de 0 hora quanto para o tempo de 8 horas, mostrando que a levedura *C. tropicalis* possui ativamente seu mecanismo de obtenção de energia, assim como seu metabolismo fermentativo durante todo o processo para produção de bioetanol.

Em 0 hora foram observadas muitas funções de formação de energia celular, ATP, adaptação a estresses ambientais, fenótipo clássico de levedura fermentadora, em contrapartida em 8 horas, além das funções clássicas que vimos em 0 horas há uma alta

expressividade de funções nucleares ligadas a histonas, spliceossoma, slicing alternativo, entre outros.

Esses mecanismos podem ser compreendidos pelo fato que em 8 horas a levedura fermentadora possui seu uma perda de viabilidade, por conta do alto teor de etanol, mas ao mesmo tempo as células viáveis num estado metabolicamente ativo.

O aumento de transcrições, splicings e spliceossomas é significativo, servindo como um efeito rebote da perda celular, as células produzem muito mais transcrições e proteínas como fosfatases, redutases, transferases para chegar ao fim do processo integra e metabolicamente ativa.

Esses dados podem ser confirmados pelos estudos de Shi, 2017 e Scheres et al, 2017 que mostram a ação do splicing em formar pré-mRNA através de exóns e introns, assim como a do spliceossoma de concatenar todas essas junções e formar um mRNA para a transcrição. Essas atividades nucleares estão relacionadas com o perfil celular, mostrando mais uma vez o comportamento fermentativo da levedura *C. tropicalis*.

4.4 miRNAs

4.4.1 miRNAs - Cana de Açúcar

Os 25 miRNAs específicos da cana de açúcar estão listados e nomeados na tabela 4.

Tabela 4: Identificação nominal, espécie e sequência gênica dos 25 miRNAs de cana de açúcar selecionados para os ensaios de RT-PCR.

Identificação	Espécie	Sequência Gênica
pta-miR166a	<i>Pinus taeda</i>	UCGGACCAGGCUUCAUUC CCC
ssp-miR528	<i>Saccharum ssp.</i>	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG
sof-miR396	<i>Saccharum officinarum</i>	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
ssp-miR437c	<i>Saccharum ssp.</i>	AAAGUUAGAGAAGUCUGACUU
sof-miR156	<i>Saccharum officinarum</i>	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
ssp-miR827	<i>Saccharum ssp.</i>	UUAGAUGACCAUCAGCAAACA
sof-miR408a	<i>Saccharum officinarum</i>	CUGCACUGCCUCUUC CUGGC
ssp-miR444a	<i>Saccharum ssp.</i>	UGCAGUUGUUGCCUCAAGCUU
ssp-miR159a	<i>Saccharum ssp.</i>	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG
sof-miR159a	<i>Saccharum officinarum</i>	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG
sof-miR408e	<i>Saccharum officinarum</i>	CUGCACUGACUCUUC CUGGC
ssp-miR156	<i>Saccharum ssp.</i>	UGACAGAAGAGAGUGAGCACA
ssp-miR167b	<i>Saccharum ssp.</i>	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG
sof-miR159c	<i>Saccharum officinarum</i>	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU
ssp-miR1128	<i>Saccharum ssp.</i>	UACUACUCCUCGUGCCAAA
ssp-miR168a	<i>Saccharum ssp.</i>	UCGCUUGGUGCAGAUCCGGAC
sof-miR159e	<i>Saccharum officinarum</i>	UUUGGAUUGAAAGGGAGCUCUU
ssp-miR1432	<i>Saccharum ssp.</i>	CUCAGGAAAGAUGACACCGAC
ssp-miR444b.1	<i>Saccharum ssp.</i>	UUGUGGCUUUCUUGCAAGUUG
ssp-miR437a	<i>Saccharum ssp.</i>	AAAGUUAGAGAAGUUUGACUU
sof-miR167a	<i>Saccharum officinarum</i>	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG
ssp-miR169	<i>Saccharum ssp.</i>	UAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
ssp-miR437b	<i>Saccharum ssp.</i>	AAAGUUAGACAAGUUUGACAU
ssp-miR444c-3p	<i>Saccharum ssp.</i>	UGCAGUUGUUGUCUCAAGCUU
sof-miR168b	<i>Saccharum officinarum</i>	UCGCUUGGGCAGAUCCGGAC

*miRNAs das espécies: ssp = *Saccharum ssp.* e sof = *Saccharum officinarum*

4.4.2 DataAssist

Para os ensaios de RT-PCR primeiramente foi verificado o resultado da nossa placa da amostra de caldo de cana, onde foram apresentados a expressão dos 25 miRNAs selecionados dessa amostra, como pode ser verificado no anexo I. Esse resultado foi

positivo, pois a partir dele, para todas as outras análises dos nossos ensaios, essa placa de expressão dos miRNAs do caldo de cana foi utilizada como controle.

Procurando obter uma maior acurácia da expressão dos miRNAs, todos os dados das amostras do contaminante *C. tropicalis* (C4) nos tempos de 0 e 8 horas, bem como da levedura *S. cerevisiae* (PE-2) para os mesmos tempos, foram submetidos ao programa *DataAssist* com controles normalizados, valores em \log^2 e estatística de $p \leq 0,05$ de cada condição em comparação analisada.

A análise do software *DataAssist*, mostrou em expressão geral, para todas as amostras de 11 miRNAs diferencialmente expressos. Após essa quantificação absoluta, foram analisadas cada condição individualmente das amostras (CC- C0; CC -C8; CC-P0 e CC-P8). E ainda assim analisamos também a condição das amostras agrupadas C0-C8 (contaminante *C. tropicalis*-C4) e P0-P8 (levedura *S. cerevisiae*- PE-2), colocando como controle para estas análises, o tempo de 0 hora.

Os resultados dos miRNAs diferencialmente expressos nas condições citadas acima, podem ser visualizados na tabela 5.

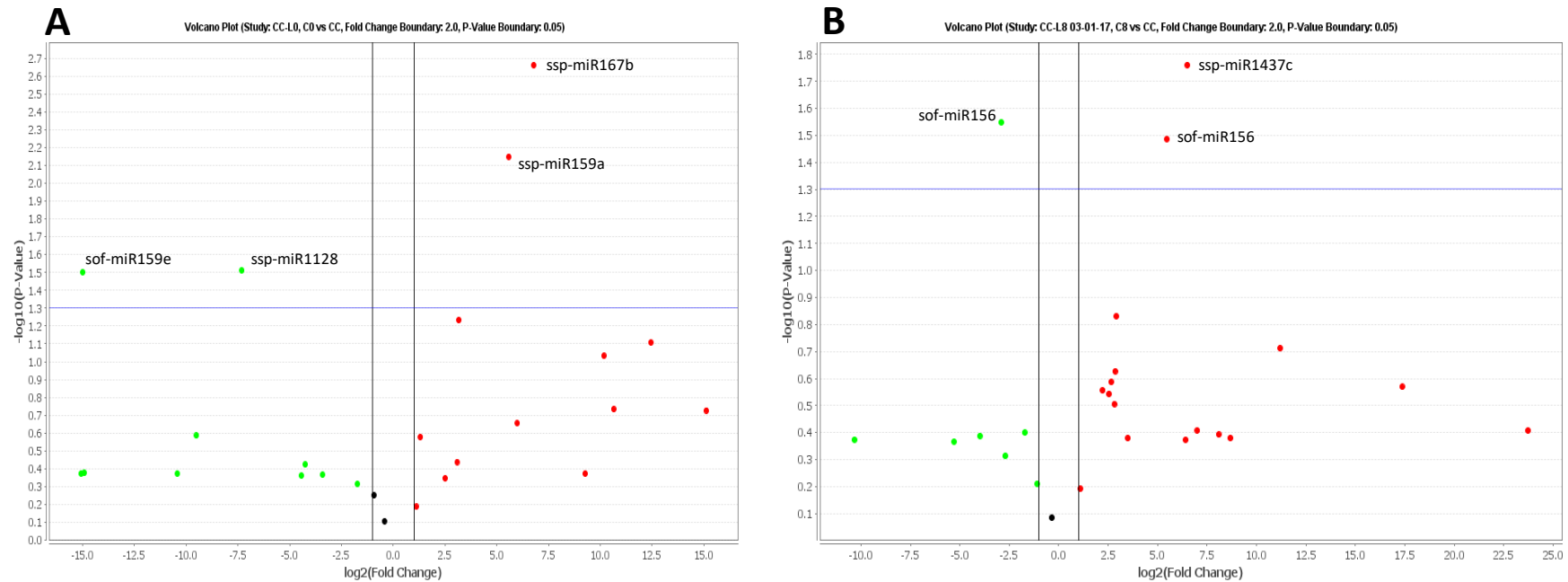
Tabela 5: miRNAs diferencialmente expressos, com valores de *fold change* normalizados e em \log^2 de todas as condições individualmente analisadas das amostras do contaminante *C. tropicalis* (C4): CC-C0, CC-C8 e amostras das levedura *S. cerevisiae* (PE-2): CC-P0, CC-P8. Análises das amostras agrupadas, contaminante *C. tropicalis* (C4): C0-C8 e levedura *S. cerevisiae* (PE-2): P0-P8.

miRNAs	p-value	Fold-change
CC-CO		
sof-miR159e	0,031551	0,0000311
ssp-miR1128	0,030778	0,0063020
ssp-miR159a	0,007100	47,814330
ssp-miR167b	0,002200	109,86300
CC-C8		
sof-miR159e	0,028265	0,1329240
sof-miR156	0,017342	44,214591
ssp-miR437c	0,032542	90,849101
CC-P0		
sof-miR159e	0,031550	0,000015
ssp-miR1128	0,030474	0,000898
CC-P8		
ssp-miR1128	0,030424	0,0000380
ssp-miR437c	0,0008840	217,79473
ssp-miR156	0,002248	104,43554
ssp-miR437a	0,011144	77,140748
sof-miR168b	0,028613	603,58562
ssp-miR444c-4p	0,049011	46,945472
sof-miR396	0,038221	154,21633
CC-C8		
sof-miR156	0,031816	321,932986
ssp-miR437c	0,017378	302,278964
ssp-miR167b	0,000208	0,0638270
P0-P8		
ssp-miR437c	0,001004	1,3945,35429
ssp-miR156	0,002248	356,465,81830
ssp-miR437a	0,011692	153,264,6977
sof-miR168b	0,028529	154,911,7194
sof-miR396	0,038175	119,125,5367
ssp-miR444c-3p	0,048018	209,700,2083
ssp-miR1128	0,034609	0,008855

*miRNAs com expressão induzida representados pela coloração verde; miRNAs com expressão reprimida representados pela coloração vermelha.

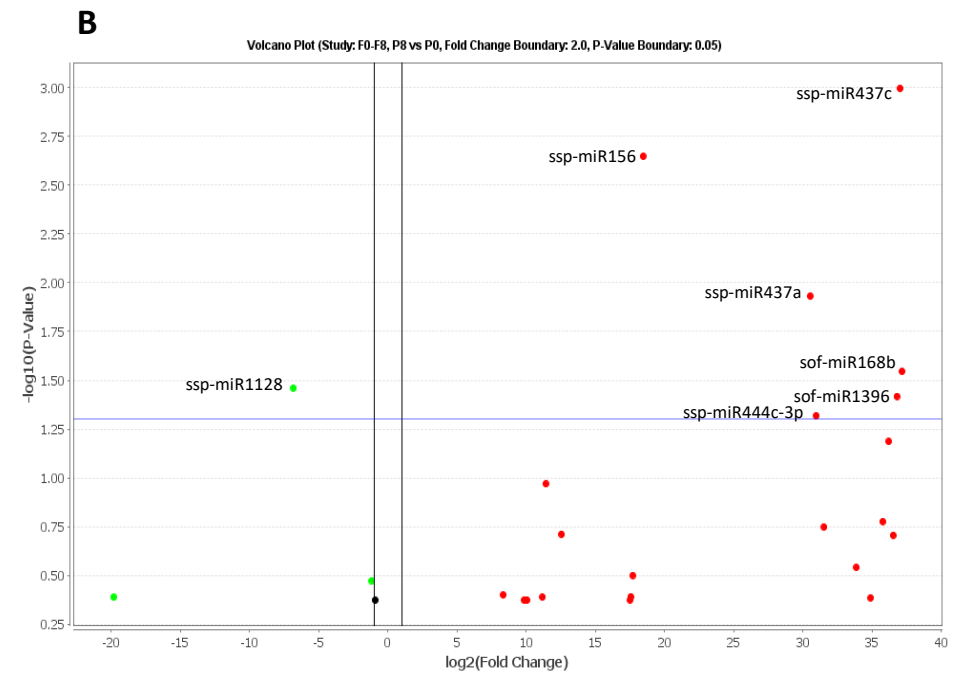
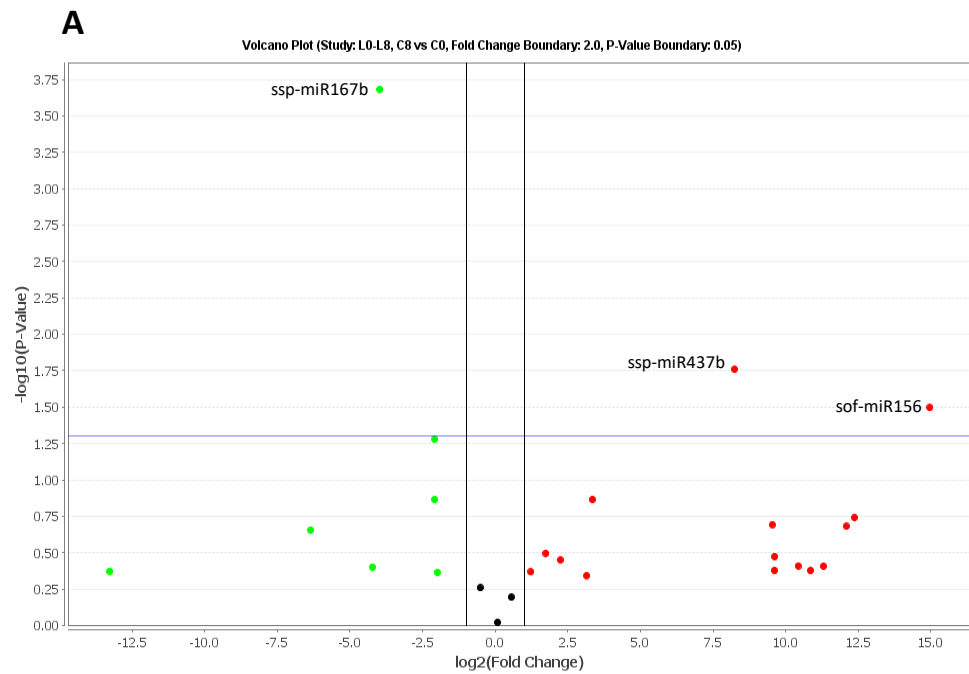
Esses resultados podem ser confirmados pelo gráfico *Volcano Plot* que foi adquirido pelas análises diferenciais do software *DataAssist*TM para todas as condições analisadas, mostrando os miRNAs diferencialmente expressos para cada situação. Na figura 16A foi observado os resultados da expressão dos miRNAs do contaminante *C. tropicalis* (C4) no tempo de 0h comparado ao controle caldo de cana (CC), esses resultados representam a expressão de 4 miRNAs (dois reprimidos e dois induzidos). Assim como a figura 16B que representa os miRNAs diferencialmente expressos para o contaminante no tempo de 8 horas comparado também ao caldo de cana de açúcar (CC), apresentando 3 miRNAs (um reprimido e dois induzidos).

Figura 16: Volcano Plot dos perfis de miRNAs detectados nas amostras do contaminante *Candida tropicalis* (C4). O eixo-X mostra o Fold Change (RQ) em \log^2 da expressão de miRNAs entre amostra teste e controle, enquanto o eixo-y mostra o valor de P em \log^{10} ajustado para cada miRNA. Os pontos representados acima da linha cinza horizontal indicam significância estatística ($p \leq 0,05$). Pontos em verde indicam miRNAs reprimidos e em vermelho miRNAs induzidos. **(A)** Análise diferencial do contaminante C4 no tempo de 0 hora (C0) comprado ao controle caldo de cana de açúcar (CC); **(B)** Análise diferencial do contaminante C4 no tempo de 8 horas (C8) comprado ao controle caldo de cana de açúcar (CC).



Na figura 17A foi observado os resultados da expressão dos miRNAs da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) no tempo de 0h comparado ao controle caldo de cana (CC), esses resultados representam a expressão diferencial de 2 miRNAs (dois reprimidos). Assim como a figura 17B que representa os miRNAs diferencialmente expressos para a levedura PE-2 no tempo de 8 horas comparado também ao caldo de cana de açúcar (CC), apresentando 7 miRNAs (um reprimido e seis induzidos).

Figura 18: Volcano Plot dos perfis de miRNAs detectados nas amostras agrupadas do contaminante *Candida tropicalis* (C4) quanto da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). O eixo-X mostra o Fold Change (RQ) em \log^2 da expressão de miRNAs entre amostra teste e controle, enquanto o eixo-y mostra o valor de P em \log^{10} ajustado para cada miRNA. Os pontos representados acima da linha cinza horizontal indicam significância estatística ($p \leq 0,05$). Pontos em verde indicam miRNAs reprimidos e em vermelho miRNAs induzidos. **(A)** Análise diferencial da condição agrupada do contaminante C4 (C0-C8) no tempo de 0 hora (C0) comprado com o tempo 8 horas (C8); **(B)** Análise diferencial da condição agrupada da levedura PE-2 (P0-P8) no tempo de 0 hora (P0) comprado ao tempo de 8 horas (P8).



4.4.3 Funções dos miRNAs Diferencialmente Expressos: *psRNA Target s Plant Small RNA Target Analysis*

Os 11 miRNAs significativamente expressos em todas as condições isoladas tanto do contaminante *C. tropicalis* (C4) quanto da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), foram avaliados quanto a suas possíveis funções preditas pelo software *psRNA Target: A Plant Small RNA Target Analysis*. Para cada similaridade da sequência dos miRNAs maduros com o genoma de *Saccharum officinarum* foram apontando os mRNAs de cada miRNA analisado, e também uma função predita. Esses resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Funções dos miRNAs diferencialmente expressos no RT-PCR nas amostras C0, C8, P0 e P8, para as condições individuais CC-C0, CC-C8, CC-P0 e CC-P8 obtidas pelo software *psRNA Target: A Plant Small RNA Target Analysis*.

Identificação	Espécie	miRNA maduro	Target mRNA	Função Putativa
ssp-miR437c	<i>Saccharum ssp.</i>	AAAGUUAGAGAAGUCUGACUU	GUGCUCUCUCUCUUCUGUCA	Proteína semelhante à proteína quinase
sof-miR156	<i>Saccharum officinarum</i>	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	UCGAUCAUGCUUGCAGCUUCA	Proteína Myb
ssp-miR159a	<i>Saccharum ssp.</i>	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	AAGAGCUCCCUUGCAUCCAAU	Proteína Squamosa (SBP)
ssp-miR167b	<i>Saccharum ssp.</i>	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG	UCGAUCAUGCUUGCAGCUUCA	Fator de Auxina
ssp-miR1128	<i>Saccharum ssp.</i>	UACUACUCCUCCGUCCAAA	UUUGAAAUGGAGGGAGUAGUA	Hypothetical protein
sof-miR159e	<i>Saccharum officinarum</i>	UUUGGAUUGAAAGGAGCUCUU	UGCAGUUACUUUCAUCCAAA	Hypothetical protein
ssp-miR437a	<i>Saccharum ssp.</i>	AAAGUUAGAGAAGUUUGACUU	AAGUCAACUUCUCUAACUUU	Serina/Treonina Proteína Quinase
ssp-miR444c-3p	<i>Saccharum ssp.</i>	GCAGUUGUUGUCUCAACUUU	AUUCUUGAGACAACAACUGGA	Homologo Sintase Vacuolar: subunidade proteolítica de 16KDa de ATP
sof-miR168b	<i>Saccharum officinarum</i>	UCGCUUGGGCAGAUCCGGGAC	GUCCCGAUCUGCACCAAGCGA	Fator de Crescimento 5
sof-miR396	<i>Saccharum officinarum</i>	UCCACAGCUUUCUUGAACUG	CCGUUCAAGAAAGCCUGUGGA	Fator de Crescimento 5
ssp-miR156_SYBR	<i>Saccharum ssp.</i>	UGACAGAAGAGAGUGAGAGCG CACA	UGUGCUCUCUCUCUUCUGUCA	Proteína Hipotética

Ao analisar os miRNAs diferencialmente expressos do contaminante *C. tropicalis* no tempo 0 hora, foi observado a presença do ssp-miR167b, este por sua vez corresponde a um fator de resposta à auxina. Esta é caracterizada como um hormônio essencial no crescimento das plantas. Quando correlacionada aos fungos, a auxina está relacionada ao crescimento celular, correlacionando com o resultado da expressão de miRNA, pois em 0 hora é o início de proliferação celular em um processo de fermentação (Pierre-Jerome et al, 2017).

O ssp-miR156 no tempo de 8 horas corresponde a um tipo proteína *myb*. Em plantas como o sorgo, esta proteína expressa um fator conhecido como MYB, que está ligado a fatores de transcrição em particular a vários processos bióticos e abióticos em uma situação de estresse. Em levedura, esses fatores estão ligados à tolerância ao estresse diretamente no desenvolvimento e na diferenciação celular. O aumento deste miRNA mostra que esse fator pode estar envolvido com o crescimento celular, além de demonstrar como o contaminante se adapta e recruta interações de outros processos para se manter viável durante os estágios do processo fermentativo, em especial ao fim da fermentação (Ambawat et al, 2013).

Em outro ponto de vista, os miRNAs que deram significativamente reprimidos expressaram um comportamento no nível de crescimento celular, o que é indicativo da condição de 0 horas. O ssp-miR1128 está ligado a uma proteína hipotética atuada pela expressão do gene CA1. Estudos mostram que em leveduras do gênero *Candida* ssp. este gene associado com a enzima tiamina difosfoquinase, que faz parte do metabolismo da tiamina. A tiamina na levedura é necessária para o metabolismo do crescimento celular nos processos de fermentação, quanto maior o valor de tiamina no meio, maior a taxa de fermentação, pois está diretamente ligada às condições anaeróbicas (Schultz et al, 1937; Traveyan et al, 1954). Como esse miRNA é reduzido, a confirmação da baixa produtividade da *C. tropicalis* (C4) pode ser associado, corroborando com o comportamento visualizado em nossos resultados.

Às 8 horas, os miRNAs regulados positivamente estão associados à estrutura celular e às condições de estresse. Este comportamento é visto onde o tempo de 8 horas é o pico de produção de etanol, o que caracteriza um ambiente adverso para os micro-organismos devido às altas concentrações térmicas e de etanol.

miRNAs que foram diferencialmente expressos como ssp-miR437c mostram a expressão de uma proteína semelhante à quinase, que possui um domínio catalítico que as proteínas fosfato adutoras que estão envolvidas em processos de lucro celular (Miranda-Saavedra et al, 2007). Essas proteínas quinases também podem estar envolvidas na sinalização de proteínas de choque térmico, como chaperonas sob condições de estresse, o que é comprovado em 8 horas de fermentação (Rivera-Calzada et al, 2017).

O sof-miR159a, que apresentou expressão induzida no tempo de 0 horas, está associado à proteína de ligação ao promotor de squamosa (SPL). Nas plantas essa proteína está relacionada ao desenvolvimento de flores e frutos e resposta a toxinas e micro-organismos (Jung et al, 2012). Esta proteína adiciona um gene COPT6 que está ligado à assimilação de cobre. O cobre é necessário no desenvolvimento das plantas, mas em leveduras atua na membrana plasmática, onde sob condições de excesso pode levar à toxicidade, inibindo o crescimento celular, retardando a fermentação (Ruta et al, 2017).

O resultado mais interessante que foi observado foi o miRNA sof-miR159e, que apresentou expressão reduzida em ambos os tempos (0 e 8 horas). Este miRNA está associado a uma proteína hipotética que expressa um gene CA2 que tem a ligação ao metabolismo de Ca^{2+} . O cálcio é um mineral necessário para o ciclo celular em leveduras, regulando o ciclo celular, onde a deficiência deste pode causar uma parada transitória do crescimento da fase G1, seguido do bloqueio G2/M (Iida et al, 1990; Miyakawa et al, 2007). Isso é observado quando verificamos o fenotípico de capacidade fermentativa do nosso contaminante de *C. tropicalis*, explicando a hipótese do porque a levedura não poderia ter uma taxa de fermentação igual aos padrões usados, mesmo apresentando produção de bioetanol. O que se pode argumentar é que, na verdade, esse contaminante pode ter parado seu crescimento no início do ciclo, consumindo todo os açúcares necessários para formar somente biomassa e não ter uma atividade vigente como uma levedura de excelência fermentação.

Assim, nossos resultados mostraram que os miRNAs podem ser transferidos da cana de açúcar para levedura, atuando no desempenho durante o processo de fermentação. A análise de cada um dos miRNAs expressos significativamente para o contaminante *C. tropicalis* (C4) nos dois tempos (0 e 8 horas) demonstrou que todos estão ligados à estrutura, proliferação e crescimento celular, levando a uma condição que estes miRNAs possam estar atuando diretamente no desempenho da atividade metabólica do

contaminante C4, sendo o caminho para as hipóteses de possíveis alvos para um antifúngico específico de descontaminação do processo fermentativo.

4.4.4 Predição de Alvos miRNAs – miRNA-Gene/Alvo

Diante dos resultados obtidos pelo RNA-seq, foi realizado a busca de possíveis alvos entre interação dos 11 miRNAs diferencialmente expressos previamente analisados com os genes resultantes do sequenciamento de RNA do contaminante *C. tropicalis*. Como resultado foi verificado a expressão significativa de 6 genes alvos em 4 miRNAs, através do alinhamento das sequências maduras entre si, como mostra a tabela 7.

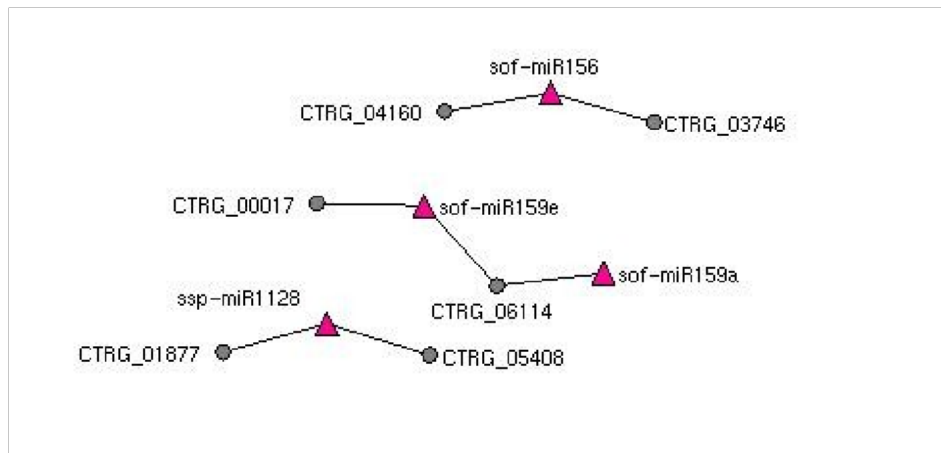
Tabela 7: Identificação dos possíveis alvos de miRNAs e seu gene alvo de interação, obtidos pelo software RNA22, através da análise de expressão do RT-PCR para os miRNAs e sequenciamento de RNA (RNA-seq) para os genes, das amostras C0 e C8.

miRNA	Gene(s) Alvos
sof-miR159e	CTRG_00017 e CTRG_06114
sof-miR159a	CTRG_06114
ssp-miR1128	CTRG_01877 e CTRG_05408
sof-miR156	CTRG_04160 e CTRG_03746

Quando observamos a correlação entre, foi possível verificar que três miRNAs (sof-miR159e, ssp-miR1128 e sof-miR156) regulam dois genes CTRG_00017 e CTRG_06114, CTRG_01877 e CTRG_05408, assim como os CTRG_04160 e CTRG_03746, respectivamente. Um único gene CTRG_06114 foi regulado por dois miRNAs (sof-miR159e e sof-miR159a) e um único miRNA regulando exclusivamente um gene, sof-miR159a regula somente o CTRG_06114.

Esses resultados podem ser visualizados de uma melhor maneira através do *software Navigator*, com este foi possível distribuir esses miRNAs-genes alvos em forma de uma rede de interação. Essa rede não foi possível ser realizado, pois o número de miRNAs bem como o número de genes, são relativamente pequenos e também por esses miRNAs regularem genes que não se interagem entre si, mas conseguimos ver a interação desses poucos resultados como mostrado na figura 19.

Figura 19: Rede de interação dos possíveis alvos de miRNAs diferencialmente expressos nas amostras C0, C8, P0 e P8 com genes diferencialmente expressos nos sequenciamento (RNA-Seq) do contaminante *C. tropicalis*. Triângulos de coloração rosa representam os miRNAs e os círculos em coloração cinza representam os genes-alvos.



Se detalharmos os miRNAs bem como seus alvos que somente foram expressos no tempo de 0h ou 8 horas, são classificados um para cada tempo específico.

Pela interação miRNA (ssp-miR159a) com gene alvo CTRG_06114 no tempo de 0 hora, foi observado que esse gene foi descrito com funções nas vias de transporte de nutrientes, estresse oxidativo e autofagia através da produção de proteínas de membrana. Estudo de Gournas et al, 2018, apresenta que em leveduras, o domínio mais bem estudado são os que estão atuando em nível de membrana, principalmente os que contem a arginina permease. Esses dominios correspondem a invaginações estáticas, semelhantes a sulcos, da membrana plasmática e se associam a estruturas subcorticais denominadas "eisosomes", que incluem reguladores de detecção de estresse de membrana e transportadores de nutrientes (Gournas et al, 2018).

A autofagia por sua vez em células de *Candida* é mostrada em estudos como de Reyna-Beltrán et al, 2018. Esse estudo por sua vez revela que a presença da atividade da enzima transglutaminase pode atuar no efeito fenotípico da célula, onde seu bloqueio da atividade enzimática inclui inibição do crescimento de células de levedura, indução de autofagia em, alteração do padrão de divisão normal da levedura, e alterações na parede celular (Reyna-Beltrán et al, 2018).

Somando a funcionalidade do gene com a ação do miRNA, podemos ter como hipótese que em 0 hora o contaminante de *C. tropicalis* (C4) possui atividades induzidas nas vias de transporte de nutrientes, estresse oxidativo e autofagia fazendo com que ela se torna viável durante as primeiras horas do processos bem como se adaptando as condições adversas que este se inicia. Um dos pontos que podemos citar para adaptação

do estresse seria a atuação do recrutando das proteínas *Myb-like* nas células, fazendo com que as concentrações de metais como o cobre, essenciais na planta e encontradas no caldo de cana, não atuam na membrana da levedura.

Um sistema complementar de miRNA-gene alvo pode ser visto nessa condição, e sendo comprovado pelos resultados obtidos nos ensaios anteriores, onde na capacidade fermentativa a célula se encontra ativa e na expressão diferencial dos genes, a presença aumentada de genes para membrana, transporte de açúcares e estresse são encontrados.

Para o tempo de 8h observamos que um dos genes que o miRNA (sof-miR156) atua é o CTRG_0416, teste ligado a produção de uma proteína quinase. Estudos para *C. tropicalis* apontam que esse tipo de proteínas possuem funções de formação de glicerol, já sendo estudos utilizados para este fim, como o de Ji et al, 2016. Esse estudo ainda nos direciona que essas quinases podem atuar num processo fermentativo como proteínas de resistência por conta da produção de glicerol na célula. Com isso a levedura passa a ter a seu favor um arsenal multirresistente contra fatores adversos da fermentação como choque osmótico, aumento de temperatura, concentração de etanol, já comprovados no final da fermentação com o tempo de 8 horas (Ji et al, 2016).

Essas hipóteses podem ser visualizadas no mesmo estudo concomitante com o estudo de Ahmad et al, 2013 mostrando que ao se interromper a via através quebrar essas proteínas quinases no ciclo, ocorre a diminuição de glicerol, resultando e em aumento da sensibilidade ao estresse osmótico, ácido acético e estresse oxidativo. Com isso, se nossa interação cana de açúcar vs levedura foi comprovada induzida, significa que o alvo do contaminante de *C. tropicalis* possa ser uma via ligada ao glicerol, favorecendo sua sobrevivência durante todo o ciclo, como mostrado pelos nossos resultados anteriores (Ahmad et al, 2013).

Entretanto, o segundo gene alvo do miRNA sof-miR156 está relacionado com histonas, assim ligado a fatores de transcrição e proliferação celular. Comprovadamente é conhecido que as histonas possuem um papel crítico na regulação da transcrição, no ciclo celular, na replicação do DNA e no reparo de danos no DNA nos processos pós-transcricionais (Basnet et al, 2016).

Estudo de Chatterjee et al, 2016 mostra que histonas em leveduras estão associadas a a cromatina que por sua vez ligadas aos centrômeros nos cromossomos. O centrômero possui função de garantir uma segregação precisa dos cromossomos. Esta segregação sendo vista de alta fidelidade de cromossomos replicados no momento da

divisão celular para células filhas garante a levedura uma proliferação celular eficiente (Chatterjee et al, 2016).

Mantendo assim uma dinâmica bem coordenada, a integridade do genoma da levedura é preservada e a replicação ocorre normalmente. Essa ação gênica pode ser observada em nossos resultados, pois no tempo de 8 horas o contaminante *C. tropicalis* se manteve ativo e com uma sobrevivência acima de 90%, mostrando sua presente replicação celular. Esses resultados podem ainda ser comprovados, quando são observados os dados de sequenciamento de RNA, onde ao tempo de 8 horas, os genes diferencialmente expressos induzidos estão associados a fatores de transcrição, histonas e resistência levando a hipótese que mesmo em 8 horas esse contaminante continua com sua divisão e conseqüente proliferação celular ativos.

Se olharmos as interações que esse miRNA (sof-mir156) apresenta, podemos observar que todo o mecanismo se complementa. A função dele se completa com a função dos genes, mostrando que essa interação pode ser ativo em vias de replicação celular. Bem como também para o gene CTRG_0416 que está associado a resistência, onde é uma via que este miRNA pode também estar atuando. Não sabemos se essa interação miRNA-genes atua de forma isolada ou conjunta, mas podemos crer na hipótese pelos resultados anteriores que essa ação no contaminante *C. tropicalis* (C4) no processo fermentativo possa estar ocorrendo de forma conjunta.

Com estes resultados preliminares, podemos concluir que há uma transferência entre diferentes espécies (cana de açúcar vs levedura) e uma ação dos xenomiRs, podendo ser um indicativo de possíveis biomoléculas para descontaminação nos processos de fermentação alcoólica. Pensando em uma biomolécula antifúngica potencial específica e natural contra o contaminante *C. tropicalis*, seria a construção de uma fita antimir que atuasse bloqueando as vias induzidas encontradas na interação miRNA-genes nos tempos 0 hora e 8 horas. A atuação desse antimir seria de forma a bloquear vias essenciais como assimilação de nutrientes e sensibilidade a fatores de estresse, bem como o bloqueio de níveis moleculares para proliferação celular. Uma ação complementar no dinamismo da levedura durante o processo podendo levar a redução e morte do contaminante.

4.4.5 Alinhamento Gênico de *C. tropicalis* e micro-organismos contaminantes e não contaminantes: *Blast*

Com os resultados dos possíveis alvos de miRNAs em *C. tropicalis*, de uma forma canônica, foi observado o resultado também de uma complementariedade perfeita através do programa *Blast*. Como resultado foi possível observar o alinhamento 100% de todos os seis possíveis alvos de miRNA em genoma de *C. tropicalis*, sugerindo uma possível atuação desses alvos nesse micro-organismo. Mas também foi observado o alinhamento em níveis superiores a 30% em muitos outros contaminantes, algumas espécies de leveduras que possuem poder de contaminação. Em contrapartida quando foi observado com critério a homologia de alinhamento em *S. cerevisiae* (espécie de levedura padrão industrial) observamos um alinhamento mínimo de menos de 20%, sugestivo de uma possível ação desses miRNAs como antifúngicos para espécies como a *C. tropicalis* e possíveis outros contaminantes e não possuindo atividade nas leveduras usuais de *S. cerevisiae*, como mostrado nas tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Tabela 8: Identificação da homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_00017 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, obtidos pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_00017			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida dubliniensis</i>	2e-66	89%
	<i>Candida albicans</i>	1e-55	72%
	<i>Spathasphora passalidarum</i>	2e-41	78%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	9e-46	61%
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	7e-41	61%
	<i>Hiphopichia butonii</i>	6e-29	63%
	<i>Candida orthopsilosis</i>	1e-19	48%
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1e-19	44%
	<i>Candida parapsilosis</i>	3e-19	48%
	<i>Candida tanzawaensis</i>	6e-16	71%
	<i>Candida tenuis</i>	2e-10	44%
	<i>Pichia sorbitophila</i>	7e-09	39%
	<i>Ascoidea rubescens</i>	2e-04	13%
	<i>Komagataella pastoris</i>	0.29	14%
	<i>Komagataella phaffii</i>	3.5	8%
	<i>Pichia pastoris</i>	3.5	9%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.5	4%
	<i>Cercospora beticola</i>	3.5	8%
	<i>Sphaerulina musiva</i>	3.5	9%
	<i>Rasansonia emersonii</i>	3.5	8%

Tabela 9: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_06114 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_06114			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida maltosa</i>	7e-28	49%
	<i>Candida albicans</i>	2e-10	22%
	<i>Spathasphora passalidarum</i>	3e-14	19%
	<i>Hiphopichia butonii</i>	1e-11	11%
	<i>Candida dubliniensis</i>	2e-10	22%
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	4e-05	19%
	<i>Candida parapsilosis</i>	1e-11	16%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.063	24%

Tabela 10: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_01887 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_01877			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida albicans</i>	0.0	99%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	8e-15	41%
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	2e-16	41%
	<i>Hiphopichia butonii</i>	2e-17	39%
	<i>Candida orthopsilosis</i>	5e-14	82%
	<i>Pichia sorbitophila</i>	2e-75	53%
	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	8e-16	38%
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	8e-14	39%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.73	7%
	<i>Melampsora larici-populina</i>	4e-47	21%

Tabela 11: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_05408 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_05408			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida albicans</i>	9e-15	82%
	<i>Candida dubliniensis</i>	2e-14	81%
	<i>Candida tanzawaensis</i>	7e-91	74%
	<i>Candida auris</i>	2e-72	73%
	<i>Candida orthopsilosis</i>	2e-67	77%
	<i>Candida tenuis</i>	1e-61	70%
	<i>Candida intermedia</i>	8e-33	67%
	<i>Spathasphora passalidarum</i>	4e-87	74%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1e-81	73%
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	3e-82	73%
	<i>Hiphopichia butonii</i>	2e-10	76%
	<i>Pichia sorbitophila</i>	0.021	90%
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.074	83%
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	2e-66	71%
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	6e-66	72%
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	9e-39	68%
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	6e-35	69%
	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	4e-30	68%
	<i>Ogataea polymorpha</i>	5e-04	65%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.81	5%

Tabela 12: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_04160 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_04160			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida albicans</i>	1e-15	78%
	<i>Candida dubliniensis</i>	7e-16	79%
	<i>Candida tanzawaensis</i>	2e-82	68%
	<i>Candida auris</i>	3e-41	71%
	<i>Candida orthopsilosis</i>	1e-10	69%
	<i>Candida parapsilosis</i>	6e-10	69%
	<i>Spathasphora passalidarum</i>	2e-16	78%
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	3e-28	67%
	<i>Naumovozya castellii</i>	2e-09	91%
	<i>Naumovozya dairenensis</i>	2e-12	65%
	<i>Eremothecium cymbalariae</i>	2e-11	66%
	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	7e-11	67%
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	6e-81	71%
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	8e-99	73%
	<i>Hiphipichia butonii</i>	6e-10	75%
	<i>Pichia sorbitophila</i>	2e-69	67%
	<i>Pichia pastoris</i>	2e-10	65%
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	2e-05	76%
	<i>Komagataella pastoris</i>	6e-18	66%
	<i>Komagataella phaffii</i>	2e-10	65%
	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	2e-17	68%
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	3e-09	64%
	<i>Lachancea lanzarotensis</i>	5e-06	68%
	<i>Tetrapisispora blattae</i>	3e-16	65%
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	7e-11	67%
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	2e-62	69%
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	9e-92	71%
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	4e-39	68%
	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	4e-45	68%
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3e-40	67%
	<i>Ogataea polymorpha</i>	5e-04	77%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.011	6%

Tabela 13: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_03746 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa *Blast*.

Gene ID	Espécie Micro-organismo	e-Value	Identidade
CTRG_03746			
	<i>Candida tropicalis</i>	0.0	100%
	<i>Candida albicans</i>	1e-15	66%
	<i>Candida dubliniensis</i>	7e-16	65%
	<i>Oryzias latipes</i>	4e-36	73%
	<i>Lethenteron camtschaticum</i>	3e-32	76%
	<i>Eimeria acervulina</i>	1e-18	69%
	<i>Eimeria tenella</i>	2e-07	68%
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	2e-07	68%
	<i>Larimichthys crocea</i>	7e-08	71%
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	9e-07	72%
	<i>Spathasphora passalidarum</i>	1e-04	71%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.011	4%

Com esses resultados, foi possível observar que diferentes gêneros de leveduras potenciais contaminantes de fermentação alcoólica, foram encontrados com alta identidade para os genes alvos. Dessa forma, mostrando que os miRNAs identificados, podem possuir espectro estendido para os genes de diferentes contaminantes fermentativos.

5. CONCLUSÕES

- Concluímos que *C. tropicalis* (C4) é um contaminante que atrapalha potencialmente o processo fermentativo e o rendimento de bioetanol, porque possui uma atividade metabólica constante até o final do processo, com viabilidade celular maior que *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), assimila os principais açúcares utilizados como nutrientes de maneira significativa, reduzindo substratos importantes para levedura padrão, atrapalhando na produção de bioetanol.
- O estudo mostrou de maneira inédita que miRNAs de cana de açúcar são capazes de interferir no genoma de leveduras, assim comprovamos a presença de XenomiRs entre reinos diferentes;
- Dos 25 miRNAs selecionados *in silico* de cana de açúcar foram identificados 11 miRNAs significativamente expressos nas leveduras (*S. cerevisiae* e *C. tropicalis*).

- O estudo do transcriptoma de *C. tropicalis* identificou 954 genes relacionados ao processo fermentativo, sendo 444 reprimidos e 507 induzidos. Desta forma, para os genes reprimidos, foi observado aqueles relacionados ao metabolismo de aminoácidos, membrana, transporte de açúcares, piruvato descarboxilase e acetilcoA e para os induzidos, genes ligados a transcrição, splicing e spliciossoma, membrana e resistência, mostrando que a levedura contaminante compete significativamente também para o metabolismo.
- Foram identificados *in silico* em *C. tropicalis* 6 genes/alvos (CTRG_00017, CTRG_06114, CRTG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 e CTRG_03746) que se relacionaram com 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 e sof-miR156). Duas interações específicas (interação apenas com *C. tropicalis*) foram identificadas por dois miRNAs (sof-miR 159a e sof-miR156) e que interagiram com três genes/alvos (CTRG_06114, CTRG_0416 e 03746);
- Os seis genes/alvos de *C. tropicalis* que interagiram com os quatro miRNAs identificados de cana de açúcar estavam presentes com percentual de alta identidade em diferentes gêneros de leveduras. A identificação *in silico* desses gêneros realizada pelo *blast* mostrou a interação de aproximadamente de 36 espécies de leveduras contaminantes de diferentes ecossistemas;
- Os quatro miRNAs identificados não mostraram interação *in silico* com *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ser utilizados como biomoléculas potenciais antifúngicas para o controle da contaminação de dornas de fermentação para a produção de bioetanol;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; SHIM, W.Y.; KIM, J.H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 36. n. 9. p. 1279-84, 2013.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in Alcoholic Fermentation Processes. Role of Physiological Fitness and Microbial Interactions. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.100. p. 2035- 46, 2016.
- ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Sci Agr.** v. 60. n. 4. p. 677- 81, 2003.
- ALEKSEEVA, O.U.; SABIRZIANOVA, T.A.; ALIAK, I.O.; KALEBINA, T.S.; KULAEV, I.S. Export of an invertase by yeast cells *Candida utilis*. **Prinke Biokhim Mikrobiol.** v. 50. n. 2. p.156- 02, 2014.
- ALVAREZ, F.; CORREA, L.F.M.; ARAÚJO, T.M.; MOTA, B.E.F.; CONCEIÇÃO, L.E.F.R.; CASTRO, I.M.; BRANDÃO, R.L. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **J Int Food Microbiol.** v. 190. p. 97-104, 2014.
- AMBAWAT, S.; SHARMA, P.; YADAV, N.R.; YADAV, R.C. MYB transcription factor Genes as Regulation for Plant Responses. an overview. **Physiol Mol Biol Plants.** v. 19. n. 3. p. 307- 21, 2013.
- AMORIM, H.V. Fermentação Alcólica Ciências & Tecnologia. **Fermentec.** Piracicaba, p. 448, 2005.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum. Composition and usage. In: Ingledew WM, Kelsall AGD, Kluhspies C (eds). **The alcohol textbook.** University Press, Nottingham, pp 39–46, 2009.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ethanol Production in a Petroleum Dependent World. The Brazilian Experience. **In Sugar J.** v. 67. p. 11 - 14, 2005.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 91. p. 1267 - 75, 2011.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 91. p. 1267- 75, 2011.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M.L.F. Uso de antibióticos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência. Campo Grande. **Embrapa Gado de Corte.** p. 50, 2004.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proálcool. **In Sugar J.** v. 109. p. 195200, 2007.

ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.R.S.; RODRIGUES, M.I. Métodos de caracterização de leveduras de processos utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB Açúcar, Alcól e Subprodutos.** v. 15. n. 6. p. 32-35, 1997.

ÁRINO, J. Integrative Responses to High pH Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS.** v. 14. p. 517- 23, 2010.

ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology. Tool for the unification of biology. **Nature Genetics.** v. 25. n. 1. p. 25- 29, 2000.

BARBRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R.W.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA A.J.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuelethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol Genet Genomics.** v. 28. p. 485-94, 2012.

BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O. F.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and indentification of wild yeast contaminats of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol.** v. 56. p. 322-26, 2008.

BASNET, H.; SU, X.B.; TAN, Y.; MUSENHELDER, J.; MERKURJIV, D.; OHGI, K.A.; HUNTER, T.; PILLUS, L.; ROSENFELD, M.G. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. **Nature.** v. 516. n. 7530. p. 267-71, 2014.

BASSI A.P.; da SILVA, J.C.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTININI, S.R. Effects of single and combined cell treatment based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentations of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Word J Microbiol Biotechnol.** v. 29. p. 1661- 76, 2013.

BASSO, C.P.; TENSO, A.; DARAN, J.M.; GOMBERT, A.K.; van MARIS, A.J.; PRONK, J.T.; STAMBUCK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metab Eng.** v. 13. n. 6. p. 694- 03, 2011.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 8. p. 1155- 63, 2008.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil. The industrial process and its impact on yeast fermentation. **In Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2nd ed; Bernardes M.A.S.; Eds; InTech. Croatia, Rijeka, 2011; 5. 85–100.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, A.H. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. **In. Congresso Nacional da STAB**, 5, Águas de São Pedro, Anais p. 45-49, 1993.

BASYUK, E.; SUAVET, F.; DOGLIO A.; BORDONNE, R.; BERTRAND, E. Human let-7 Stem-loop Precursor Harbor Features of RNase III Cleavage Products. **Nucleic Acids Res.** v. 31. p. 6593- 97, 2003.

BELTRADE, E.; VANDENBERGUE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; SIGOILLOT, J.C.; FAULDS, C. Green Energy and Technology, ed, **Springer International Publishing**. USA, New York, 2016; 175-212; ISBN. 978-3-319-30203-4

BISCHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC. K.A.; LEATHRS. T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 31. n. 11. p. 739- 44, 2007.

BODMAN, J.A.; YANG, Y.; LOGAN, M.R.; EITZEN, G. Yeast Translation Elongation Factor-1A Binds Vacuole-localized Rho1p to Facilitate Membrane Integrity Through F-actin Remodeling. **J Biol Chem.** v. 290. p. 4705- 16, 2015.

- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a Flexible Tool for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics** (Oxford, England). v. 30. p. 2114- 20, 2014.
- BORIA, I.; BOATTI, L.; PESOLE, G.; MIGNONE, F. NGS-Trex. Next Generation Sequencing Transcriptome Profile Explorer. **BMC Bioinformatics**. v. 14. p. 1 - 8, 2013.
- BRANCO, P.; FRANCISCO, D.; MONTEIRO, M.; ALMEIDA, M.G.; CALDEIRA, J.; ARNEBORG, N.; PRISTA, C.; ALBERGARIA, H. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 101. n. 1. p. 159- 71, 2017.
- BRANDÃO, L.R.; MEDEIROS, A.O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **J Water Health**. v. 8. n. 2. p. 279- 89, 2010.
- BRANDISS, M.C.; FALVERY, D.A. Proline Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Analysis of PRO3 Gene, which Encodes delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase. **J Bacteriology**. v. 174. p. 3782- 88, 1992.
- BROW, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Res**. v. 13. p. 277-90, 2013.
- BUTHER, G.; RASMUSSEN, M.D.; LIN, M.F.; SANTOS, M.A.; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C.A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**. v. 459. p. 657- 62, 2009.
- CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Sci Agr**. v. 56. n. 1. p. 1- 2, 1999.
- CAMARASA, C.; SANCHEZ, I.; BRIAL, P.; BIGELY, F.; DEQUIN, S. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* During Wine Fermentation. Evidence for Origin-dependent Metabolic Traits. **Plos One**. v. 6. p. 1- 12, 2011.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol. an

Overview About Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation. **J Biomedicine and Biotechnology**. v. 2. p. 1 - 15, 2012.

CARRILO-NEVES, D.; RUIZ, H.Á.; AGUILAR, C.N.; ILYINA, A.; PARRA-SALDIVAR, R.; TORRES, J.Á.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.L. Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. **Bioresour Technol**. v. 239. p. 430- 36, 2017.

CARRINGTON, J.C.; CUPERUS, J.T.; FAHLGREEN, N. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. **Plant Cell**. v. 23. p. 431- 42, 2011.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.J.P.L.; NORONHA, M.F.; CALDERÓN, L.A.L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J.L.; PEREIRA, G.A.G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microb Cell Fact**. v. 14. p. 1–13, 2015.

CASTELLANI, A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **Lancet**. v. 179, p. 13- 15, 1992.

CHANG, L.S.; KIM, B.H.; SKIN, P.K.; LEE, W.K. Bacterial contaminants and its effects on ethanol fermentations. **J Microbiol Biotechnol**. v. 5. p. 309- 14, 1995.

CHATTERJEE, G.; SANKARANARAYANAN, S.R.; GUIN, K.; THATTIKOTA, Y.; PADMANABHAN, S.; SIDDHARTHAAN, K.; SANYAL, K. Repeat-associated fission yeast-like regional centromeres in the ascomycetous budding yeast *Candida tropicalis*. **Plos Genet**. v. 12. v. 2. p. 1- 28, 2016.

CHÁVEZ, F.P.; PONS, T.; DELGADO, J.M.; RODRÍGUES, L. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (INV1) from the yeast *Candida utilis*. **Yeast**. v. 14. n. 13. p. 1223- 32, 1998.

CHEN, X.; YU, B.; YANG, Z.; LI, J.; MINAKNINA, S.; YANG, M.; PADGETT, R.W.; STEWARD, R. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. **Science**. v. 307. p. 932- 35, 2005.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **J Biosci Bioeng.** v. 123. n. 3. p. 342- 6, 2017.

CHOWDHURY, A. R.; CHITTY, M.; VINM, N. X. Evaluating Influence of microRNA in Reconstructing Gene Regulatory Networks. **Cogn Neurodyn.** v. 8. p. 251- 9, 2014.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.; FONTANELLI, C.S. Sugarcane vinasse. Environmental implications of its use. **Waste Manag.** v. 33. n. 12. p. 2752- 61, 2013.

CIOCH, M.; SATORA, P.; SKOTNICZNY, M.; SEMIK-SZCZURAK, D.; TARKO, T. Characterization of antimicrobial properties of extracts of selected medical plants. **Pol J Microbiol.** v. 66. n. 4. p. 463- 72, 2017.

CONAB. Levantamento da safra 2017/18 – Março 2018. Disponível em. www.conab.gov.br. Acessado em 22 de Março, 2018, 19.25.

COPERSUCAR, Fermentação – Centro de Tecnologia Copersucar – Divisão Industrial, CTDI, 1987.

COSTA, M.C.; LEITÃO, A.L.; ENGUITA, F.J. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs. Insights from the Point of View of Structural Biology. **J Mol Sciences.** v. 13. p. 10268- 95, 2012.

COSTA, O.U., SOUTO, B.M.; TUPINAMBÁ, D.P.; BERGMANN, S.C.; KYAW, C.M.; KRUGER, R.H.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in Brazilian distillery using a culture-independent method. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 42. n. 1. p. 73- 84, 2015.

DAS, K.; GARNICA, O.; DHANDAYUTHAPANY, S. Modulation of Host miRNAs by Intracellular Bacterial Pathogens. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 6. p. 1- 14, 2016.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of Control of microRNA Biogenesis. **J Biochem.** v. 148. p. 381- 92, 2010.

De SOUZA, R.S.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.; JORÚN, B.; LOZANO, N.; da SILVA, M.J.; GONZALÉZ-GUERRERO, M.; de ARAÚJO, L.M.; VEREZA, N.C.; BAGHERI, H.C.;

IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Sci Rep.** v. 30. n.6. p. 1-15, 2016.

DELLIAS, M.T.F.; BORGES, C.D.; LOPES, M.L.; da CRUZ, S.H.; de AMORIM, H.V.; TSAI, S.M. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of *Lactobacillus* contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 2018. doi. 10.1007/s10482-018-1050-82018

DENYER, S.P.; MAILLARD, J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.** v. 92, 35S–45S, 2002.

DIEZMMAN, S.; COX, C.J.; SCHONIAN, G.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa. a multigenic analysis. **J Clin Microbiol.** v. 42. p. 5624- 35, 2004.

DILON, S. L.; SHAPTER, F. M.; ROBERT, H. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, S.L. Domestication to Crop Improvement. Genetic Resources for Sorghum And *Saccharum* (Andropogoneae). **Ann Bot.** v. 5. p. 975 – 989, 2007.

DOI, M.; HOMMA, M.; CHINDAMPORN, A.; TANAKA, K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PEGE) in medically important *Candida tropicalis*. **J Gen Microbiol.** v. 138. p. 2243- 51, 1992.

DUCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Appl Microb.** v.12. n. 2. p. 173-77, 1964.

EGEA, T.C.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; RIGONATO, J.; MONTEIRO, D.A.; GRIENING, D.; da SILVA, H.; van der WIELEN, F.; HELMES, R.; PARSONS, J.R.; GOMES, E. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Helvion.** v. 28. n. 2. p. 1- 24, 2017.

ERYASAR, K.; KARASU-YALCIN, S. Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. 3. **Biotech.** v. 6. n. 2. p. 1- 7, 2016.

EUGHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação,** São Paulo. v. 2. n. 22. p. 35- 9, 2007.

FABRIS, L.; CALIN, G.A. Circulating Free xeno-microRNAs – The New Kids on the Block. **Mol Oncol**. v. 10. p. 503- 08, 2016.

FERREIRA, T.H.; GENTILE, A.; VILELA, R.D.; COSTA, G.G.L.; DIAS, L.I.; ENDRES, L.; MENOSSI, M. microRNAs Associated with Drought Response in the Bioenergy Crop Sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plos One**. v. 7. p. 1- 14, 2012.

GARCIA-VILLEGAS, R.; CAMACHO-VILLASANA, Y.; SHINGÚ-VÁZQUEZ, M.A.; CABRERA-ORIFICE, A.; URIBE-CARVAJAL, S.; FOX, T.D.; PÉREZ-MARTINEZ, X. The COX 1 C-terminal Domain is a Central Regulator of Cytochrome C Oxidase Biogenesis in Yeast Mitochondria. **J Biol Chem**. v. 292. p. 10912- 25, 2017.

GENTILE, A.; FERREIRA, T.H.; MATTOS, R.S.; DIAS, L.I.; HOSHINO, A.A.; CARNEIRO, M.S.; SOUZA, G.M.; CALSA, T.JR.; NOGUEIRA, R.M.; ENDRES, L.; MENOSSI M. Effects of Drought on the Microtranscriptome of Field-grown Sugarcane Plants. **Plant**. v.237, p.783- 98, 2013.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; MORGE, C.; SPARROW, C.; LIU, Y.; QUINTANILLA-CASAS, B.; VICHE, S.; ALEXANDRE, H. Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen Source Preferences, Impact on Sequential Fermentations and Wine Volatile Compounds Profile. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. p. 1- 13, 2017.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol Biofuels**. v. 1. p. 6- 15, 2008.

GOURNAS, C.; GKIONIS, S.; CARQUIM, M.; TWYFFELS, L.; TYTECA, D.; ANDRÉ, B. Conformation dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 3. n. 15. p. 3145- 54, 2018.

GRIFFITHS-JONES, S.; KOZOMARA, A. miRBase. Integrating microRNA Annotation and Deep-Sequencing Data. **Nucl Acids Res**. v. 39. p. 52- 7, 2011.

HAMONTS, K.; TRIVEDI, P.; GARG, A.; JANITZ, C.; GRINGER, J.; HOEFORD, P.; BOTHA, F.C.; ANDERSON, I.C.; SINGH, B.K. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environ Microbiol**. v. 20. n.1. p. 124- 40, 2018.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.H.; NAM, J.W.; ZHANG, B.T.; KIM, V.N. Molecular Basics for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. **Cell**. v.125. p. 887 - 90, 2006.

HAN, S.; LIANG, Y.; LI, Y.; DU, W. Long Noncoding RNA Identification. Comparing Machine Learning Based Tools for Long Noncoding Transcripts Discrimination. **Biomed Res Int**. v. 2016. p. 1- 14, 2016.

HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; van MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. The Ehrlich Pathway for Fuel Alcoholic Production; a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Appl Environ Microbiol**. v. 74. p. 2259- 66, 2008.

HECK, G.R.; VASHUTA, S.; BANKS, I.R.; WIGGS, B.E.; ZHANG, Y.; ZIEGIER, T.E.; JAMES, K. Regulation of Gene Expression in Plant Through miRNA Inactivation. **Plos One**. v. 6. p. 1 - 11, 2011.

IIDA, H.; SAKAGUCHI, S.; YAGAWA, Y.; ANRAKU, Y. Cell Cycle control by Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol Chem J**. v. 265. n. 34. p. 21216- 22, 1990.

JI, H.; ZHUNGE, B.; ZONG, H.; LU, X.; FANG, H.; ZHUGE, J. Role of CgHOG1 in stress response and glycerol overproduction of *Candida* glyceriogenesis. **Curr Microbiol**. v. 73. n. 6. p. 827- 33, 2016.

JI, L.; ZHENG, T.; ZHAO, P.; ZHANG, W.; JIANG, J. Ethanol production from a biomass mixture or furfural residues with green liquor peroxide saccharified cassava liquid. **BMC Biotechnol**. v. 1. n. 16, p. 48, 2016.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Regulation of Hydrogen Sulfite Liberation in Wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by Assimilable Nitrogen. **Appl Environ Microbiol**. v. 61. p. 461- 7, 1995.

JOLLY, N.P.; VAREKA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your Ordinary Yeast. Non-*Saccharomyces* yeasts in Wine Production Uncovered. **FEMS Yeast Res**. v. 14. p. 215- 37, 2014.

JORNAL DA CANA, Serie 2, n. 245, Ribeirão Preto, Julho, 2014.

JOVICIC, A.; GLITER, A. D. Distinct Repertoires of microRNAs Present in Mouse Astrocytes Compared to Astrocyte Secreted Exosomes. **Plos One**. v. 12. p. 1 -11, 2017.

- JUNG, H.; GAYOMBA, S.R.; RUTZKE, M.A.; CRAFT, E.; KOCHIAN, L.V.; VATAMANIEEK, O.K. COPT6 is a Plasma Membrane Transporter that Functions in Copper Homeostasis in Arabidopsis and is a Novel Target of SQUAMOSA Promoter-binding Protein-like -7. **Biol Chem J**. v. 287. n. 40. p. 33252- 67, 2012.
- KAHAR, P.; RIYANTI, E.I.; OTSUKA, H.; MATSUMOTO, H.; KIHIRA, C.; OGINO, C.; KONDO, A. Challenges of Non-Flocculating *Saccharomyces cerevisiae* Haploid Strain Against Inhibitory Chemical Complex for Ethanol Production. **Biores Technol**. v. 245. p. 1436- 46, 2017.
- KATAWAKA, T.; TOMARI, Y. Making RISC. **Trends Biochem Sci**. v. 35. p. 368- 76, 2010.
- KEMSAWAD, V.; VIANA, T.; ARDO, Y.; ARNEBORG, N. Influence of Nitrogen Sources on Growth and Fermentation Performance of Different Wine Yeast Species during Alcoholic Fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 99. p. 10191- 10207, 2015.
- KHALID, A.; ZHANG, Q.; YASIR, M.; LI, F. Small RNA Based Genetic Engineering for Plant Viral Resistance. Application in Crop Protection. **Front Microbiol**. v. 8. p. 1- 11, 2017.
- KHANDUJA, J. S.; CALVO, I. A.; JOH, R. I.; HILL, I. T.; MOTAMEDI, M. Nuclear Noncoding RNAs and Genome Stability. **Mol Cell**. v. 63. p. 7- 20, 2016.
- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S.L. HISAT. a Fast Splice Aligner with Low memory Requirements. **Nature Methods**. v.12. p. 357- 60, 2015.
- KUMAR, A. A fungus among us. The emerging opportunistic pathogen *Candida tropicalis* and PKA signaling. **Virulence**. 2018. doi. 10.1080/21505594.2018.1438026.
- KURSU, V.A.S.; PIETIKÄINEN, L.P.; FONTANESI, F.; AALTONEN, M.J.; SUOMI, F.; NAIR, R.R.; SCHONAUER, M.S.; DIECHMANN, C.L.; BARRIENTOS, A.; HILTUNEN, J.K.; KASTANIOTES, A.J. Defects in Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Result in Failure of Multiple Aspects of Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**. v. 90. p. 824- 40, 2013.
- KUTZMAN, C.P. (2011) *Scheffersomyces*. KUERTZMAN and M SUZUKI (2010) In. KURTZMAN CP; FELL JM; BOCKHOUT, TT (eds) The yeasts. a taxonomic study, 5Th edn. **Elsevier**, p. 773- 77, 2011.

LIDZBARRSKY, G.A.; SHKOLNIK, T.; NEVO, E. Adaptive Response to DNA-damaging Agents in Natural *Saccharomyces cerevisiae* Populations from “Evolution Canyon”, Mt. Carmel, Israel. **Plos One**. v. 4. p. 1 - 8, 2009.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M.; WARRINGER, J.; JAMES, S.A. Populations Genomics of Domestic and Wild Yeasts. **Nature**. v. 458. p. 337- 41, 2009.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M.; WARRINGER, J.; PARTS, L.; JAMES, S.A.; DAVEY, R.P.; ROBERTS, I.N.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V.; TSAI, I.J.; BERGMAN, C.M.; BENSASSON, D.; O'KELLY, M.J.; VAN OUDENAARDEN, A.; BARTON, D.B.; BAILES, E.; NGUYEN, A.N.; JONES, M.; QUAIL, M.A.; GOODHEAD, I.; SIMS, S.; SMITH, F.; BLOMBERG, A.; DURBIN, R.; LOUIS, E.J. Populations genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**. v. 458. p. 337- 4, 2009.

LIU, D.; HU, R.; PALLA, K. J.; TUSKAN, G. A.; YANG, X. Advances and Perspectives on the Use of CRISPR/Cas9 Systems in Plant Genomics Research. **Plant Biology**. v. 30. p. 70-7, 2016.

LOPES, M.B.; SILVA, T.M.B. Teste de Sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos do processo de fermentação. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v. 4. n. 3. p. 445 -65, 2011.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.B. N.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil. A bridge between science and industry. **Braz J Microbiol**. v. 47. p. 64-76, 2016.

LOVE, M.; HUBER, W.; ANDRES, S. Moderated estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. **Genome Biol**. v. 15. n. 50. p. 1- 21, 2014.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E. Green house gases emissions in the productions and use of ethanol from sugarcane in Brazil. The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**. v. 32. p. 582-95, 2008.

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**. v. 290. p. 1- 18, 2002.

- MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Functions of microRNAs and Related Small RNAs in Plants. **Nat Genetics**. v. 38. p. 531- 37, 2006.
- MALONE, C.D.; BRENNECKE, J.; DUS, M.; STARK, A.; McCOMBIE, W. R.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**. v. 137. p. 522- 35, 2009.
- MANUAL DE RECOMENDAÇÕES. Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Álcool. Instituto de Pesquisa Tecnologia. v. 1817. p. 796, 1990.
- Mc CLELLAND, L.J.; MOU, T.C.; JEAKINS-COOLEY, M.E.; SPRANG, J.R.; BROWEER, B.E. Structure of a Mitochondrial Cytochrome C Conformer Competent for Peroxidase Activity. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 111. p. 6648- 53, 2014.
- Mc RAE, I.J.; MA, E., ZHOU, M.; ROBINSON, C.V.; DOUDNA, J.A. In vitro Reconstitution of the Human RISC-loading Complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105. p. 512- 17, 2008.
- MIRANDA-SAAVEDRA, D.; BARTON, G.J. Classification and Functional Annotation of Eukaryotic Protein Kinases. **Proteins**. v. 68. n. 4. p. 893- 41, 2007.
- MIYAKAWA, T.; MIZUNUAMA, M. Physiological Roles of Calcinerium in *Saccharomyces cerevisiae* with Special Emphasis on its roles G2/M Cell-cycle Regulation. **Biosci Biotechnol Bioch**. v. 71. n. 3. p. 633- 45, 2007.
- MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program, 1996. Disponível em. www.mct.gov.br. Acesso em 12 de Abril, 2017, 14.20.
- NARVHUS, J.Á.; GADAGA, T.H. The role of interation between yeasts and lactic acid bactéria in African fermented milks. A review. **Int J Food Microbiol**. v. 86. n. 1-2, p. 51- 60, 2003.
- NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**. v. 41, n. 1, p. D8–D20, 2013.
- NEWMAN, M.A.; HAMMOND, S.M. Emerging Paradigms of Regulated microRNA Processing. **Genes Dev**. v. 24. p. 1086 - 92, 2010.
- NOBRE, T.P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Cienc. Tecnol. Aliment**. v. 27. n. 1. p. 20- 25, 2007.

OKADA, C.; YAMASHITA, E.; LEE, S.J.; SHIBATA, S.; KATAHIRA, J.; NAKAGAWA, A.; YONEDA, Y.; TSUKIHARA T. A High Resolution Structure of the pre-microRNA Nuclear Export Machinery. **Science**. v. 326. p. 1275 - 79, 2009.

OLIVEIRA, A.J. et al. Métodos para controle microbiológico na produção de açúcar e álcool. **Fermentec**. Piracicaba, p. 89, 1996.

PAES, L.A.; OLIVEIRA, M.A. Potential Trash Biomass of the Sugar Cane Plant. **PNUD and CTC**. p. 19, 2005.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRICG, N.R. **Microbiologia**. Conceitos e aplicações. 2ed. São Paulo, SP. [s.n], v. 2, 1997.

PENG, X.; SUN, J.; ISEVENTANT, D.; MICHELS, C.; VERACHTERT, H. Flocculation and coflocculation of bactéria by yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 55. n. 6. p. 51- 60, 2001.

PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnol Lett**. v. 34. p. 45- 53, 2012.

PERGE, P.; NAGY, Z.; DECMANN, A.; IGAZ, I.; IGAZ, P. Potential Relevance of microRNAs in Inter-species Epigenetic Communication, and Implications for Diseases Pathogenesis. **RNA Biol**. v. 28. p. 1- 11, 2016.

PIERRE-JEROME, E.; WRIGHT, R.C.; NEMHAUSER, J.L. Characterizing Auxin Response Circuits in *Saccharomyces cerevisiae* by Flow Cytometry. **Methods Mol Biol**. v. 1497. p. 271- 81, 2017.

PITANGUI, N.S.; SARDI, J.C.; SILVA, J.F.; BENADUCCI, T.; MORAES da SILVA, R.A.; RODRÍGUEZ-ALRELLANES, G.; TAYLOR, M.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Adeshion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**. v. 28. n. 7. p. 711- 8, 2012.

PLACE, R.F.; LI, L.C.; POOKOT, D.; NOONAN, E.J.; DAHIYA, R. MicroRNA -373 Induces Expression of Genes with Complementary Promoter Sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105. p. 1608- 13, 2008.

POETHING, R.S.; PARK, M.Y.; WU, G.; GONZALEZ-SULSER, A.; VAUCHERET, H. Nuclear Processing and Export of microRNAs in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 102. p. 11928- 33, 2005.

QI, Y.; WU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; NI, F.; LIU, C. DNA Methylation Mediated by a microRNA Pathway. **Mol Cell**. v. 38. p. 465 - 75, 2010.

QUINLAN, A.R.; NALL, I.M. BED Tool: a Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features. **Bioinformatics**. v. 26. p. 841- 42, 2010.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZNSKA, A.; MAROSZYNSKA, M. Selected essential oils as antifungal agents against antibiotic-resistant *Candida ssp* in vitro study on clinical and food-borne isolates. **Microb Drug Resist**. v. 23. n. 1. p. 18-24, 2017.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F.J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**. v. 16. n. 3. p. 203-222, 2017.

REVISTA QUÍMICA REAL. Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca. Belo Horizonte. **Kamoran News**. v. 1. n. 1, mar. 2009.

REVISTA RPA NEWS CANA & INDUSTRIA, Ano 13, n. 17, Julho 2015.

REYNA-BELTRÁN, E.; IRANZO, M.; CALDERÓN-GONZÁLEZ, K.G.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; LABRA-BARRIOS, M.L.; MORMENEO, S.; LUNA-ARIAS, J.P. The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. **J Biol Chem**. v. 293. n. 12. p. 4304- 23, 2018.

RIVERA-CALZADA, A.; PAL, M.; MUNOZ-HERNANDEZ, H.; LUQUE-ORTEGA, J.R.; GIL-CARTON, D.; DEGEISPOSTI, G.; SKEBEL, J.M.; PRODROMOU, C.; PEARL, C.; LLORCA, O. The Structure of the R2TP Complex Define a Platform for Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular Chaperone System. **Structure**. v. 25. n. 7. p. 1145- 52, 2017.

RUCKLE, L.; SENIN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products, Nuremberg**. v. 7. n. 9, 2006.

RUTA, L.L.; KISSEN, R.; NICOLAU, I.; NEAGE, A.D.; PETRESCU, A.J.; BONES, A. M.; FARCASANU, I.C. Heavy Metal Accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* Cells Armed with Metal binding Hexapeptides Target to the Inner Face of the Plasma Membrane. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 101. n. 4. p. 5749- 63, 2017.

SCHERES, S.H.; NAGAI, K. CryoEM Structures of Splicosomal Complexes Reveal the Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing. **Curr Opin Struct Biol.** v. 46, p. 130- 9, 2017.

SCHONAUER, M.S.; KASTANIOTES, A.J.; KURSU, V.A.S.; HILTUNEN, J.K.; DIECKMANN, C. L. Lipoic Acid Synthesis and Attachment in Yeast Mitochondria. **J Biol Chemistry.** v. 284. p. 23234- 42, 2009.

SCHUTZ, A.; ATKIN, L.; FREY, C.N. A Fermentation Test for Vitamin B1. **J Am. Chem. Soc.** v. 59. n.11. p. 438- 49, 1937.

SEKI, M.; KANEUCHI, C.; KUMNNATA, J.; MANTIRUNGIJ, M.; OHOMONO, T.; KOMAGATA, K. Identification of lactic acid bacteria isolated from fermented cane molasses at alcohol plants in Thailand. Bulletin J. Federation for Culture Collection. v. 5. n. 2. p. 80- 8, 1989, **Apud Sugar Industry Abstracts.** v. 52. n. 4. p. 115, 1990.

SENEVIRATNE, C.J.; RAJAN, S.; WONG, S.S.; TSANG, D.N.; LAI, C.K.; SAMARANAYAKE, L.P. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. **Front Microbiol.** v. 7. p. 1- 8, 2016.

SESMA, A. RNA Metabolism and Regulation of Virulence Programs in Fungi. **Semin Cell Dev Biol.** v. 57. p. 120- 7, 2016.

SHI, Y. The Spliceosome. A Protein-directed Metalloribozyme. **J Mol Biol.** v. 429. p. 2640- 53, 2017.

SILVA, S.; NEGRINI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev.** v. 36. p. 288- 05, 2012.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 31. n. 9. p. 401- 8, 2004.

- SOUZA, G.M.; MENOSSI, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VICENTZ, M.; Van-SLUYS, M. Sugarcane Functional Genomics. Gene Discovery for Agronomic Trait Development. **In J Plan Gen.** v. 2008. p. 1- 11, 2008.
- STAREGA-ROSLAN, J.; KOSCIANKA, E.; KOZLOWSKI, P.; KRZYZOSIAK, W.J. The Role of the Precursor Structure in the Biogenesis of microRNA. **Cell Mol Life Sci.** v. 68. p. 2859-71, 2011.
- SUN, H.; YAROVOY, I.; CAPELING, M.; CHENG, C. Polymers in the Co-delivery of siRNA and Anticancer Drugs for the Treatment of Cancers. **J Top Curr Chem.** v. 375. p. 1- 30, 2017.
- SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **Plos One**, v. 6. n. 7. p. e21800, 2011.
- SUZUKI, T.; IMANISHE, Y.; IWAGUCHI, S.; KAMIHARA, T. Despolarized Cell Growth Proceeds Filamentation During the Process of Ethanol-induced Pseudohyphal Formation in the Yeast *Candida tropicalis*. **Microbiology.** v. 144. p. 403- 10, 1998.
- SZULC, J.; OTLEWSKA, A.; OKRASA, M.; MAJCHRZYCKA, K.; SULYOK, M.; GUTAROWSKA, B. Microbiological Contamination at Workplaces in a Combined Heat and Power (CHP) Station Processing Plant Biomass. **Int J Environ Res Public Health.** v. 14. n.1. p. 1, 2017.
- TAKAGY, H. Proline as a Stress Protectant in Yeast. Physiological Functions Metabolic Regulations, and Biotechnological Applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 81. p. 21-3, 2008.
- THOMSON, T.; LIN, H. The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs. Progress and Prospect. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 25. p. 355- 76, 2009.
- TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of Lactobacillus in with the ethanol production yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Appl Biochem.** v. 61. n.1. p. 40- 4, 2014.
- TRAVELYAN, W.; HARRISON, J.S. Studies on Yeast Metabolism. IV. The Effect the Thiamine on Yeast Fermentation. **Biochem J.** v. 57. n. 4. p. 561- 6, 1954.

- WANG, H.; LIANG, Y.; ZHANG, B.; ZHENG, W.; XING, L.; LI, M. Alkaline Stress Triggers an Immediate Calcium Fluctuation in *Candida albicans* mediated by RIM 101p and Crz1p Transcription Factor. **FEMS Yeast Res.** v. 11. p. 430- 39, 2011.
- WANG, X.; CARLSSON, A.E. A Master equation Approach to Actin Polymerization Applied to Endocytosis in Yeast. **Plos One.** v. 14. p. 1- 22, 2017.
- WARD, O. Biotecnología de la Fermentatación. Zaragoza. **Acribia.** p. 155, 1991.
- WARF, M.B.; JOHNSON, W.E.; BASS, B.L. Improved Annotation of *C. elegans* microRNAs by Deep Sequencing Reveals Structures Associated with Processing by Drosha and Dicer. **RNA.** v. 17. p.563- 77, 2011.
- WARRINGER, J.; CUBILLOS, F.A.; ZIA, A.; GJUUSLAND, A.; SIMPSON, J.D. Trait Variation in Yeast is Defined by Population History. **Plos Genet.** v. 6. p. 1 -15, 2011.
- WASMUTH, E. V.; LIMA, C. D. UniProt. the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research.** v. 45. p. 1–12, 2016.
- WATANABE, T.; TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; KANEDA, M.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; OBATA, Y.; CHIBA, H.; KOHARA, Y.; KONO, T.; NOKANO, T. Endogenous siRNAs from Naturally Formed dsRNA Regulate Transcripts in Mouse Oocytes. **Nature.** v. 453. p. 539- 43, 2008.
- WERY, M.; KWAPISZ, M.; MORILLON, A. Noncoding RNAs in Gene Regulation. **Wires Syst Biol Med.** v. 3. p. 728– 38, 2011.
- WILUSZ, J. E. Long Noncoding RNAs. Re-writing Dogmas of RNA Processing and Stability. **Biochim Biophys Acta.** v. 1859. p. 128– 38, 2016.
- WINTER, K. M. XenomiRs and miRNA Homeostasis in Health and Disease Evidence that Diet and Dietary miRNA Directly and Indirectly Influence Circulating. **RNA Biol.** v. 9. p. 1147- 54, 2012.
- WITWER, K. W.; HIRSCHI, K. D. Transfer and Functional Consequences of Dietary microRNAs in Vertebrates. Concepts in Search of Corroboration. **Bioessays.** v. 36. p. 394- 06, 2014.
- WU, J.; DELNERI, D.; O'KEEFE, T. Non – coding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. What is the function? **Biochem Soc Trans.** v. 40. p. 907- 11, 2012.

- WU, Y.; ZHOU, H.J.; CHE, J.; LI, W.G.; BEAN, F.N.; YU, S.B. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. **BMC Microbiol.** v. 14. p. 1- 12, 2014.
- YAMASHITA, A.; SCHICHINO, Y.; YAMAMOTO, M. The Long non-coding RNA World in Yeast. **Biochim Biophys Acta.** v. 1859. p. 147- 54, 2016.
- ZABED, H.; FARUG, G.; SAHU, J.N.; AZIRUN, M.S.; HASHEN, R.; BOYCE, A.M. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **Scientific World Journal.** v. 12, p. 1- 11, 2014.
- ZANCA A.S.; VICENTINI R.; ORTIZ-MOREA F.A.; DEL BEM L.E.V.; SILVA M.J.; VICENTZ M.; NOGUEIRA F.T.S. Identification and Expression Analysis of microRNAs and Targets in the Biofuel Crop Sugarcane. **BMC Plant Biol.** v.10, p.1- 13, 2010.
- ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.; GIORDANO, R.C.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 86. p. 1147 - 61, 2000.
- ZENG, Y.; CULLEN, B.R. Efficient Processing of Primary microRNA Hairpins by Drosha Requires Flanking Nonstructured RNA Sequences. **J Biol Chem.** v. 280. p. 27595- 03, 2005.
- ZHANG, L.; ZHANG, L.; DING, Z.; WANG, Z.; SHI, G. Metabolic engineering for improving ethanol fermentation of xylose by wild yeast. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.** v. 24. n. 6. p. 950- 6, 2008.
- ZHANG, Z.; YU, J.; ZHANG, D. L. Z.; LIU, F.; ZHOU, X.; WANG, T.; LING, Y.; SU, Z. PMRD. Plant microRNA Database. **Nucleic Acids Res.** v. 38. p. 806 - 13, 2010.
- ZHAO, H.; WANG, Q.; LUI, C.; SHANG, Y.; WEN, F.; WANG, F.; LUI, W.; XIAO, W.; LI, W. A Role for Respiration in Regulating Meiosis Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.** v. 4. p. 1- 28, 2018.
- ZUZA-ALVES, D.L.; de MEDEIROS, S.S.; de SOUZA, L.B.; SILVA-ROCHA, W.P.; FRANCISCO, E.C.; de ARAÚJO, M.C. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. **Front Microbiol.** v. 7. p. 1- 13, 2016.

ZUZA-ALVES, D.L; SILVA-ROCHA, W.P.; CHAVES, G.M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Front Microbiol.** v. 3. n. 8. p. 1927, 2017.

ANEXO I: Dados da expressão da placa da amostra caldo de cana de açúcar, evidenciando a expressão dos 25 miRNAs selecionados.

Document Name: Plate3 - miRNA 13-12-16					
Plate Type: Standard Curve					
User: Administrator					
Document Information					
Operator: Administrator					
Run Date: December 2016 17:11:36					
Last Modified: December 2016 18:54:05					
Instrument Type: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System					
Comments:					
SDS v1.4					
Thermal Cycler Profile					
Stage	Repetitions	Temperature	Time	Ramp Rate	Auto Increment
1	1	95.0 °C	01:00	100	
2	1	95.0 °C	01:00	100	
3	45	95.0 °C	00:05	100	
		60.0 °C	00:32	100	
4 (Dissociation)	1	95.0 °C	00:15	Auto	
		60.0 °C	01:00	Auto	
		95.0 °C	00:15	Auto	
		60.0 °C	00:15	Auto	
Standard 7500 Mode					
Data Collection : Stage 3 Step 2					
PCR Volume: 20 µL					

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm	User Defin	User Defin	User Defined #3
A1		pta-miR166a	Unknown	15,4363						68,5			
A2		pta-miR166a	Unknown	18,0044						77,8			
A3		pta-miR166a	Unknown	14,7934						85,5			
A4		ssp-miR528	Unknown	23,5603						87,9			
A5		ssp-miR528	Unknown	7,63656						83,1			
A6		ssp-miR528	Unknown	11,7492						86,5			
A7		sof-miR396	Unknown	20,446						83,5			
A8		sof-miR396	Unknown	18,7244						79,4			
A9		sof-miR396	Unknown	15,5742						65,9			
A10		ssp-miR437c	Unknown	20,019						71,9			
A11		ssp-miR437c	Unknown	11,5513						81,1			
A12		ssp-miR437c	Unknown	15,3291						86,5			
B1		sof-miR156	Unknown	20,8152						83,8			
B2		sof-miR156	Unknown	33,0644						87,5			
B3		sof-miR156	Unknown	20,6163						88,9			
B4		ssp-miR827	Unknown	1,83517						88,2			
B5		ssp-miR827	Unknown	14,6675						83,1			
B6		ssp-miR827	Unknown	21,8134						88,6			
B7		sof-miR408a	Unknown	29,0913						76,5			
B8		sof-miR408a	Unknown	41,495						88,9			
B9		sof-miR408a	Unknown	36,7387						87,5			

B10	ssp- miR444a	Unknown	20,432							70,5			
B11	ssp- miR444a	Unknown	19,8273							87,2			
B12	ssp- miR444a	Unknown	13,6208							84,2			
C1	ssp-miR159a	Unknown	27,6173							70,8			
C2	ssp-miR159a	Unknown	18,2398							70,5			
C3	ssp-miR159a	Unknown	29,6723							70,8			
C4	sof-miR159a	Unknown	15,694							71,5			
C5	sof-miR159a	Unknown	32,9522							71,5			
C6	sof-miR159a	Unknown	35,6626							71,2			
C7	sof-miR408e	Unknown	17,7801							73,2			
C8	sof-miR408e	Unknown	19,2556							71,2			
C9	sof-miR408e	Unknown	19,4403							68,8			
C10	ssp-miR156_S	Unknown	18,294							70,8			
C11	ssp-miR156_S	Unknown	17,8635							88,9			
C12	ssp-miR156_S	Unknown	26,0676							85,9			
D1	ssp-miR167b	Unknown	27,0572							70,5			
D2	ssp-miR167b	Unknown	19,8535							70,8			
D3	ssp-miR167b	Unknown	33,1362							70,5			
D4	sof-miR159c	Unknown	25,0123							88,9			
D5	sof-miR159c	Unknown	33,5762							88,2			
D6	sof-miR159c	Unknown	20,6367							87,2			
D7	ssp-miR1128	Unknown	18,1029							70,8			
D8	ssp-miR1128	Unknown	19,1841							70,5			
D9	ssp-miR1128	Unknown	19,4991							70,5			
D10	ssp-miR168a	Unknown	35,1922							70,8			
D11	ssp-miR168a	Unknown	16,3591							70,8			
D12	ssp-miR168a	Unknown	16,0924							85,9			
E1	sof-miR159e	Unknown	16,8723							87,2			

H2		unisp6- CP	Unknown	16,0776						72,9				
H3		unisp6- CP	Unknown	14,3625						72,9				
H4		unisp6- CP	Unknown	10,5865						74,8				
H5		unisp6- CP	Unknown	15,7322						72,5				
H6		unisp6- CP	Unknown	13,618						71,9				
H7		unisp6- CP	Unknown	15,2411						73,2				
H8		unisp6- CP	Unknown	14,927						72,5				
H9		unisp6- CP	Unknown	18,9568						72,2				
H10		unisp3-IPC	Standard	14,8077						70,5				
H11		unisp3-IPC	Standard	13,9068						70,2				
H12		unisp3-IPC	Standard	16,0174						69,8				

ANEXO II: Sequência gênica dos alvos encontrados na interação miRNAs-gene/avo, utilizados no alinhamento em diferentes espécies de micro-organismos contaminantes e não contaminantes pelo programa *Blast*.

CTRG_00017

ATGTCAACCAATCCTCAAGAAGATGTATATATAGAGTATTTGAATTATGATTGGAAGTCATTTACAGAAT
TCCAGGATGGTTTGCAAGAAATCTTAGAGAATTATTTAGCAAACCTTGAAAGAACAGGATGCTTCCATAAC
TACTATACCAAGCTTAGACAAGCAACAGTTGATAGATCAAGCCAAATCATTCTTTTTTTGTAACAAAACCT
GGACATATTTTGAATTTGGATGATTATAACCAATGGAAGTTACATAATGGTGATAAGTTCATAAGAAGTG
ATCAAATTGAAGAACACAAGGAAGACAAGGAAGTCGCAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGCCATACACATCCAATTATCAAGAATTAGTTGAATTG
ATTGCTCAAGGTAAACCTATTCCAGGCATAAAGCATATCCCAGACACAGTCTTGACAGACCAAGGCACAG
CTGCTTCAGCTGCTCAACGAACAAAACCTTGGGAAAAAACAACCAGTCAATGAAGAAGATACTCCTAA AAGTGATAGTTCGTA

CTRG_06114

ATGACATCCAATTGGACTGAAGACATACTAAAAGAATTGAACCTACGAGATGAAAAAGAGAAACAGAATT
CATCTTATTTTATAGCATTGAGCCAACTATCCCAGAACTAACTAACAAAGGCACCGGACACCGACCAAC
CATATCATCATCAACTGATTCATCAGTACCACCATCGTCAGGATCATCTTCATCAGACTCGCCGTCT
CCTTCACTTACTGCTCCTGTATCCAAACAAAATCAATCTACTACAGCTATCATTGATGAGTTTACATTAA
AAGAAAATCAAACGTTGAAAATGGAGAACAATGAACTAATTCAAAGCTTGAATCAATCAACTATAACGAA
TGAAAAGCTAGAATCAATAATTCAACAACAATCAAATATTATTAATCTCTAGAGAGTAAAAATACCAAG
TTGAAGAATAAAATAGATGGAATGGTACTAGAGATCAAAGAAAAGAATAAAACAATTGAGTTGATTAATG
ATGAAATATTAATAATCAAATTCAGTTCAATGTTATGCGAGACAACTTGAAAAGCTAGAGAAACAGTA A

CTRG_01877

ATGGGTAGAATAAAGAAGAAGGGAACCTCTGGTAATGCTAAGAATTCATTACCAGAACTCAAGCTATTA
AAAAATTACAAGTTTCATTAGCCGATTTCCGTCGTCTTTGTATTTCAAAGGAATTTATCCAAGAGAACC
AAGAAATAAGAAGAAGGCTAATAAAGGATCAACAGCTCCAGTTACTTTCTATTATTCAAAGATATTCAA
TATTTATTACATGAACCAGTGTTGGCCAAATTTAGACAACATAAACTTTTGCTAAAAAATTACAAAAAG
CTTTAGGTAGAGGTGAAATTGGAGACGCTTATAGATTAGATAAGCATAGACCAAGATATACTTTGAATCA
TATTATTAAGAAAGATATCCTACTTTCAATGATGCATTACGTGATTTGGATGATCCTTTAAATATGTTG
TTTTTATTTGCCAATATGCCTTCTACTGATAAAGTTTCCACTAAAATTGTTACTGATGCTGAAAAC TTAT
GTAATCAATGGTTAGCATTTGTTGCTAAAGAAAATGTTTAAAAAAGTTTTTCGTATCTATTAAGGGGT

TTATTATCAAGCTACCGTTAAAGGTCAAGAAATTAGATGGTTAGTTCCTTATAAATTCCCAACTAATATT
CCAAGTATGTTGATTTTAGAATTATGTTGACATTTTTGGAATTTATTCTACTTTATTACATTTTCGTCT
TATATAAATTATACAATGAAGCTGGTTTAGTATATCCTCCGACTATTGAAAAATCAATTGGTTTAAGTGG
TTATGTATTGGAAGACAAAAATGCTCCATTGAAAAAGAAGGAAGAAAAAATGACGAAGAAGGTAAAAAC
TTGTCAGCTAAGGAAATTTCAAAGCCATTAAGGCCGATAAAGAAGGTGATGTAGAAGAAGAAGAAGAAA
AGGACAGTGAAGGTGCTGCTGTTAGTAATGAAGATGTTGAATTAGATGAATTCACCAGCACAAAAGAAGA
TTCATTATTACAACCATCCAAAAATCAATCACCAACTTCAGAATTATTTCAAATTTTCATCTTTTATATT
GGTAGAGAAGTTCATTAGATATTTTGAATTTTGTATATTATCATGTGGTGGTAAAGTTATTTTCAGAAA
TTCAAATTGATGAATTAAGAGCCAATGATCCAGAAGCTTTTAAACAATTGAATTTATCCAATATAACTCA
TCAAATTGTTGATAGACCAAAAAATTTACAAAAAGTCCCTGGTAGAACATATATACAACCACAATGGGTA
TTTGATTGTATTAACAAACAAGAATTAGTTAACGTTAATGATTATGCCATTGGTGAAACTTTACCACCTC
ATTTATCTCCATGGGGTATGCCGGTGGTTATGATCCAAGTAAGGTTATCAAAAAGGCTGAAGGCGAAGA
AGAAGATGACGAAGAAGAAGAGGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAATCGAAGTTCAAGAAGGTGATAAA
GATCAAGAAGAAGAGGAAGAAGAAGTTGATGAAGATCTTAAAGCACAAAAGAATTAGAATTAGAAGCTG
CTGGTGTTAAATTCTCCGAAGTCAATGAAGAAGATAAGAAGAAGCAAAAAGAAAGCTAAAGCTAAACAATC
CTCAACTAAACCAGTTGATGAAGAGAAAGAATTGAAGAAGATCATGATGACCAATAAACAAAAGAAATTG

CTRG_05408

ATGTCAGATAGTAGTAGTGATTCTAATCAGCTCAATGTTGATGAGCCTAATGATTCAATTGTCACTCCACCTCCAGAAATTCCATC
TACAGAAGTCACCAGCAATCCATCCACTACTTTGAAAAGAAAAAATGAAGACACTGAAGATAATGATAGTTTAGAAGACTCTAC
AGCTCATAATAGTGGTGATATTGGTAAAGCATATTCAGCCAAGAGAGTTGCATTAGATAGTGAACAATTGGATTTGCATGATAAA
GAAGAAGAATTACAACATACTGCTCCAAAGATTAATGATAATAACAACAATAATCATTTCACTAATGATGAAGATAATGGAGAA
CGAGATGCACCTGTTGAGAAGGATCCACAAGATGAATCAGGTGAGAAGGATGAAACAAATGACAGCTCTGCTAAGCAAGATGCT
ACTCTCGAGCCAGCTTATGTACCAGAAGCATCTACCGAATCACATGCAGAAGAACCTTCATCATCTTCCAAGCCAATTTCCAACC
ATCGTGAAAAGGATGATCCTACATTTGTCCTGTTTAGAATGTATTGTCCTGTTAAGGAAGCCAGTGCAATTGTGGGGAAAAGGG
AGAAACCATCAGTCATCTCAGAGAAAAGGCGGCTGTTAGAATCACTGTAAGTGATAATTTGAAAGGTGTTCCAGAAAGAATTGTT
ACTGTTAAAGGACCTGCTGAAAATGTTGCTAGAGCTTTTGGATTGATCACCAGGGTTATTTTGAATGAACCTGAAGACGAACCTG
CTAGTATCAATTCACTACAATATAACTTGAAATTGTTAATTCCACATCCATTGATTGGGTTTATAATCGGTAAGCTGGGTTTAAAA
TTTAGAGAAATTGAAGAAAATTCTGCTGCAAACTAAAAGCTGCAGAACTCCGTTGCCATATTCTACTGATCGTGTCTTGTCTGT
TATGGGGGTTGGTGATGCTATTCACATTGCTGTTTATTACATTTCCCAAGTTATCCTTGAACATCAAGAAGTTTTAAAGAAAACA
AGATTATTTTGTACAATCCAGAAAATAATAGATACGGTGGAGATTCTCGTGACCAGCAACTTGGAGGTAGAACTGGTAATCATCA
TCAACAACCTGCAGTTACATCAACAGCAGCAACCACCACGACATTCATCAAACCACTCATCATAACAATAACCCAATGGCTTATCAA
CCAAAGATGCCACCATATGGTAAATCACTGCATCACCAACAACAACAACCGCCACAACAGCAGTCTCCTTATAACTTTTCAATGA
TGTTTCAACCTTCAGTTCAACCACAACAGTTTGGTACATCCATGGTGTCTAGTCCTAATCAAATGCCAACTCGTGGAATGCAGCCT
TCAATCAATGTGCCACCTCAAAGTCAGTACACTGATGAATTTGGAACACTTTAATTGGAGAAGTTATTACTCATCAACCAGTCC
AAGCTGGTCCTGAGAAATTCATCAGGATGTATTTGTTGCTAATTCAAGTATTGGTTCCGTCATTGGTAAAGGAGGTAACAATATC

AAACATATAAGAGAAACAAGTGCATGTACATACGTCAAGATCGAACCAGACAAAGGTCAATCCATAATGTTGGGAGGAGGTAGA
GGTATGACCAATATCAGAAAATTAACCTTGACAGGATCGATGAATTCTATTCAAACCTGCGATTTATTTGATAAATCAAAGAATAA
ATGCCGATAGAGAAAGAAACACACGTTGA

CTRG_04160

ATGGAAGAATACACTCATTATGACAAGGGTCTTTTATTAAGAGACCGATACCTTAAAGTAGCAGATATTAGTCAAGGTTCTTATG
GGTTGGTTTTAGTTGCTAAGGATGTCAAGAAGGATAATCGATTAGTTGCTGTTAAATTTATTTATCCAGTGGACTTTAAAAGGAA
ACTGACAAGAGATCATCTACTTCAACCCCTGCTAAACTATCAGCAACAGAATCCGTTTTCACTGCTTTATTGAATGAAGCCCATAA
AGAAATTAATGCATCAAATTTTAGGAGATCATCCCATATTTGAAATTATGGGATCATTTTGATACATTTTGATTTTGAAT
TTTATCCACGAGGCGATTTATACGAAGCTATCCATTCAAATTCTGGTCCTGTCACCACTCAAGATATTAACCTGGTTTTGAACAA
TTATTGGATGGTTTGAATATTGTCATAGTCGAGGAATATATCATCGAGACTTGAAGCCAGAGAATATTTAATTGATCAGGATTG
GTCTATTAAGATTTAGATTGGGGTTATCTACTACAAACAAAATTGTCACCAATCCTAATGAATTTGACATTGGATCCGAAAGAT
ATATGGCTCCAGAACTATTTGATAACAATTTGGAAGAATATGATGCTTCAAAGTTGACATTTGGTCCATTGGGATTATCTTATTA
ACCTTGGTGTTCATAAGAATCCTTTCCAAGTTGCCAATTATTCTGATAAAAGATTTATTCAGTTTGTTAATAACCGTGAAGCATT
ATTTGATATTTTTCCACCATGAGTGGTGATTTATTTTCAAGTTTTAAGATTTTCATTAACCTATTGATCCCGATAATAGAGATTTGAA
TAGTATTTCCGAAGAATTACAACCTGTTGAGATACTTTACCATTGACGAAGAGTATTGGGACAATGAAGATTACGAGGAAGAAGA
AGAGGAAGGTGAATATGAAGCAGAAGAAGGAGAGGAAGAAGAAGAAGATGAGGAAGAATTGGAAGGTTACGGATCATTCAA
GAATCATTGTCACCGTCACCAGACAGGATTGACACTCCTGCTGTTAAATCGATGGACCATCACCAGCTATTTATGTCAATAATA
AGATTGATGTGACTCCATCTGTTGGTAAAGCAGCACCACCGGTTGCAACCACGACTTCGGCTGCAGGTACAACCTGAATCACATAC

AAAAAATACCCACCAAAGGGACATCTACTGATGCTACTACTGAAATCCCACATAATCATCGAGCAGATGCATTATTATCCACA
AATACCGATTTGAAACCAATTCCAATTACTGGATTTAAATTCACCGCAATACTAGAAAACCGTTGAATGTTGCATCATATAATCA
AAATTCACAAAATACTAATCGGTTGTATAACGGGAATAACAAGTTCAATAGAGAGGATTATTTCACTCCGAGATCGGTATTTAAC
CATTATATGGATAAATACGGGAACAAAGATTTACTAAACAGTTTGATAATTTGAATAAGAAACAATCACCACCACAGAGATTTA
GAAAGAGAACTTGAAGAAAACTACAAGAAACCTCAAAAACAATCACAACAATCACAACAACCACAACAGTTTCACTATCATC
ATCAAGCAAATGACTCACATAATCATATGAATGGTAGAAGAAAATCCAGACTGTATTCTACATCTAAGTTGAGAAAAAATGTTGT
CAATGGAAATGTTCATACTAGTTTGCCATCAACATATCATCCATTACCATACCCGGCAACAATAATACTGCTACCAATGGTAATT
CCTATGGTGGATCAGGATCAGGGGCAGGCTTGCTGAATTCACAAGGGAAGTATATCCCACCATATTTAAGATCACCAAATATTC
CAAATCACCAATTGTTGAACCAGTAACTGAAGAATTGGACAATTTGAGTTTAGATTACGATGAAGTTTTCCATTTAGAAGGAGAT
TTTGAAGATACGATGCCAACACAGCCACCACCACTACAACAACAATAACAACGCATTACATCATAGTGCACATGTTGTTGAAG
GCGATCCATTGCATAAGAGATTCAATAAATCAGATAATCTTTCTCCTGCAGCTAACGGAAATTCAGGATTAGGAGGTAAGTCTT
AAGAAGAACTCCAATATAATTGCCAATAGTGCTGCCGCTACTAGAAGAGCAGTGTTTGGAGGTGAATTGAATGGTTATGCGCCA
CCAACACAACAATTGTCAAGTTCTGCTAATAGTAACAATGGTAAATATGTTCCACCATTTAGAAGAAGTTCACTTACATCTTCTAG
TGGATCGACACCAGCAGCAGTCAATGCATTTAGAAGGTCATTTGATGAAAAGAGAGACTTTCATTATTCACCACACCATTACTCT
CCACAACAACATCAACACCAACATCATAATCATCATAACTATCCGTCAACAACAACAGCTTCAGCAATCACAGCAAGCAAATC
AACATCATAGTTTGTAGATTTTACGACGGGACACATGAACAGTAGAGGGCGGTAGTTTGCATGATGGGTCTAGACCTGTATCAAGTCC
TTTATCTGAATTGAGTAAATCAGCAGTTGCAGGAACTACTGGTAAAGGACCATTTGAACAACATGCTCATTGAGGGGTTCTTATT
GAATGGGTTACATCATTTAGAAAAGATTGGTGTGATTACGATTAG

CTRG_03746

ATGTTGTCTATCGGTGATGACGTTAACTAGTCATACTAGAGCATCATAATTACCATTCTTCGATTGACTTGAATTATTCATTGGAGAAAACATGGAATTATTTTC
AGAGTTTGATTCCAGAGTTGACGAGGGATGCCTTGGAGTTGATTGTGAAGTCAAGCAAATTAATCCGACGTAATTCAGTTCATCAGTTGAATTATTACATGATT
TGGAATATCTAATTAAGTTGTATCATCCTGAAACAGATCTCAATGATGTTCTTGATTTGGTAACAAATTTGAATTCCATCTCACCTGTAAATCAAGAAAAATTGGT
CACTGCTATTGAGAGATATGATGTAECTAAAAATAATGTTGAAGAGATCGATATACCAACTCAATTAAGCTTGTTCAACAGAAGAATTCATATACATCCAAGG
ATGTTTATTATTTGGATGAATTGAATTTACCAGTCGATCAGGAGATGATCACTATTACACTGGGGAATCTTTCAGCAACTGATTTCTTAGACCCATTGATCAT
CAGCTCGGTCAAAGATGATAATTTAATTATTTTCCAACCGGTTTGATGAATCCCTACCACTTGACATTTACCTACTAAGAATAAATTTTCAATTGCAATTACAGG
GTAGAAAAATCTTATTGATATTACAAAACAATTGTTTTATAAGAGGCACATTTTCAAATATTGAGTTATTCTATATAAACAAATCTGTTGACAAGTACTATGTACG
TAATGGAATGAAATTTCCAAGTGATTATGGTTTGAAGAACTGGATGAAATCGTTGTTAGTACCAACAAAAATTGTACCAAACCTTGCTTCTCAACTACAACAAGCT
TATACAAAAATTATTGACTGATCCACTTTATTTTAAGTTTAAACAGTTTCTGTATTTGGATTTCTAACTTATTAGGAACTAAAGTGGGCCCAGAACCTGATCTACGA
ATAAAGTATCACTCCGAAGTCTTCTTCATTGATAACATCGAGCTTGTTGAGAATCATGTTCCAGACTATCACTACGAGATTATAGATATTATACTAATAATGAACA
AGTTGAATGAATTCAAAGAATATGTTGCACCAGACCATCAATTGGATTGGCAAAAAGTAAACGAAGTGTTTGTGAATGATATTTTAGCAGCCATAGAAGACCAA
AACTTGTATTTCAAATTTTGCATTTTATACAATGAATTACAAAGCCAAAATTCTCCAGGAACCTTTCAATACCATATTCAGGATCCAGCTGAACAATCATTACCTGC
TAATCAAAACGAATTGATCAAATATCTCCAGACTATCAATTCTGGTTTGAAGAGATCCATCGATAAGTCGCACTTAAAGTCTACATTGTATTCACTGACTATTGGA
GCTCTTCACAATGGTAATGTAAATGTTGAAGTCGAATTGGAGGCACCCGATGAACGTTCTATTTACCACATCAAGTTAGAAAACCAATTTCAAAGTCGAATCCT
GCTACACCACAACGTAACGTAAGACGACTGCAAATGATGAGGTTCAAACCTATTAAGAAATCAAAGATTATCCAACTTTAAAACAAAATCAATTGAATTTTGT
GGTGCCTTTGAAGATGACGATGAAGGAGCAGACGATGACGACGATGAGGAAGCTGAGGAATTGGGTAACGATTCATTTACAACCTAAGATCAAGAGAACTAAA
TACTCTCTCATTCCAGTGCTAATGCTACTCTCTTGAATGGTAACACACCAACCACTGATTCTTCTAAACAAGACTTGACAAGACAACAATAAGTACAACCTACAT
CATCATCATCATCATCATCAATTACTCGTGACGGTGATCAAAGTAGAGATGTTACGAGAAATAATGCTCGATCAGATGGAGGTCAAGAAACCGAGAATTCC

TACAATGCAGTAATTGCTGCCAGAGCTGCAGTACCACCAAGAAACAAACGAAGCCCAAGTATAAGTCAAATAGTCCTAGTATCGGGCTTGCTGCTACTTTTCA
TCCTGTATTGCCCCAGAATGTGCCACTGTATCCAGTTTCTGGTGCTATGCCGTTAGTCCCATCAGCAGCAGCGTCAGATGCTCATCAACAACAGCTGGGCTTTGT
GTCGTACAAAACACTGTATTACCACAACAACAACACCACCGGTTAATAGTAGTTTGCCAGATAACTCAAATGGAATGAATGTTATTGTCGGTAAGAATACTGTCCC
TGTTGAAGTCAATAATGTAATTCAGCCACCCGCAGGATTAGCAACATCCAAAAAATTTCTACTCCTTCATCTTTGACAAACAAACTGCGTATTCAAATTGGCAGC
AATAGTAACACTCCGAGACCGCAAGTAGCTTTACTTTTTCTTTGCCAAAGCACATTAAATTGGGAAGAACTTATAACAGTAGTGATGAAGATGCTGATGCTGAT
GCTGATCAACATAGAGATAGTGAATCCGATGAGAATGATGATCATTCAACTCAAAGTGACACTGAAAATGGAAAATCTAAAATCGATTAGATATTACAAGTAC
AATTGCTGTTCTTCAAAGAAAACAATATAAAGAAAACCAATGAAGATGTTGAAATTCCAGACATGGATGATATGGAAAGTCCTGTTGTAGAAGAGATTT
CAGAGGCACAGGATACTGGGATCACAAACCGAGATGGTGAAGAAGATAAAGAACAATATATCAAGAACATTGTCGGTAATGGTTCTCAAGTAGATGCTGATTC
TTCTACAAAATTGGCTATTGTGGACAAACGTAACGTTGATTCTACGGATTATTCAGAAAGTGAAGAGGATAAAGAACCAACCATGGAGACTCAAGAAACCCCAA
TTGAAACAGATGAAGTTGACGAAGAAAATTCAGAAGAAGTGATCTCAGAAAATAATGAAGAGAGTTCAAGTGACTCTGAAGACGACGCTAAAGAAGTTGAAT
CTAAACCGGAGGTGTTATCTTCCCATCTAGGACCAATGCTGTTGATCTGATAGATGTTGATAGTACTTCTGATAGTGAACTTCAAGCGAGTCCGAAAGTGAAT
CGGGTGGTTCTAGTACTGAATATTCTGATTCTTCTGATGAGGAATCTTCGGACGATGAACCTCTTCTCAAAGAACGCCAAAGAAAATGATCAATGAGTCTACTA
CGGTAACCTCTGTTAAGGTCACCTCTGTTAAAGTCACTCCTGTTAAAGTCACTCCTGTTAAGGTCACCTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAA
AGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAA
GCTACTCCTGCTAAAGCTACTCCTGCTAAAGGTTGTTGCTGCTAAAGCTACCCCTGCTAAGGTTGTTGCTGCTAAAGCTACCCCTGCTAAGGTTGTTGCTGCTCAAG
CTACTTCTTCTTCAAGTGCCTCTGGGTCTTAAAAGCTCAACCAATACTTCTGAGTCAAGCACCAAAACAACCTGCAAAGCGTCATCAGCAACAACCTTGAAAAAT
CAGTCAGTTCAAATCGAAGGAAAAATCTGCTGAATCAACTCCAGAAGTCTCCTCATCAAAAATCAATAAAGTTAAAGCAGGTAGTTCTGCAAGAAAATCCAAT
CCAAGAGTGTTATCTATCCTTGAGTCAAGTATCCAGGGCGGCTGCACAGGCAGCAAAAACATCACCTGTTCTTACCAATTCTTACAAAACCAAGCCAGCATT
AATATCAGGCCAGCATCATCTACAAAGCCTCAGTTAAGTGAAGAATTTGTTATAGTAGTGATGATTATTCCGAAGATGAAGATATGAAAGGTAGTGACGATGA
CTCTGATATGGATGATAAAGAAGATGATAAGCTTAAGACCACTCAAGAGAAAAATACTTCAAATAATGTTGTGAAAAATAAGGCACTTGTAACCAGTTGTTG

GATCATCACCCTGGCATCTGAAGTGAAAAAGATTTCAACTTCTCCGATCTTCAAGAGGCTTCCAAGTATTGTGCAGTCAGCAAAAAAGACACCCTTGCTAAAA
GAAGCATTTCCAGCCCGGTCAAAACGAATCTATTCAAAGGAAGACATGAATCAGATTCTAGTGATAGTGAAAGTGATGATTCAAGCGACGAACTGTCAAGTGA
CGATGAACCACTTATCAAAAAGAAACAAGTATCAAAAGAGGAAACAAAGCCTGTAGTAAGCAAGGCATCAAGTATTCGTAAAAATGTGATAGATCCGTCTGTC
TTCTATAAACCTGCAGAACCAAAAAAGAGTTCACCAGCTGCTATTTCCAAACCTGCATTAATACTAAAATCAAGACTTCCAGTGAAGAGGAAAGCTCGAGTGCCAG
TTCAAACCTTCCGAAGAAAGTAGTTCAAGTGACGACGATAGTTCAAGTGACGACGATAGCTCGAGTGATGAAAGCAGTTCTAGTCAAGATGAAAAGGACATT
CAAGTAGTGAAAAACAAAGCAAATGCTAATCAGCTGGTCACTTCAACTGGTAAAGTAGAATCTGTTGTTACACCAAGAAAACCTAATCAGGATAAGAGTTCTAG
TCAAAGGAAAGCTCCAATGACGACAGTGATGAGAGTGACAGCTCAAGTGATAGCTCCAGTGATGAAAGTCACAGTTCCACAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAGAAAGAAAAGAAAAGTGTTCCTATAGCTGTAAAACCTCCTATGGTGAAAAGAACTATTTCCAAACCAAGTTATAACCCCAAGGAAGTTTACAAAGAAA
GAAAGTTGAGTAGCGACAGCAGTTCCTCAGAGGATTCATCTGATGATAGTTCCAGTGATGACGAAGATGGTGATAGTTCTCCGAAAGTACCAAACCAATAA
ATTGGTGGTCAAAACACCATCTACAGTAAGAACAATGCCAGCACATAGAATTACTAAACCTTCTGCTGCAAGAACACCAAGTAGTAAGTTCATAGAAGATGCTG
CAAAAAGAATTGCGGCCAGTTAGAGGAGGAAACTCCTTCCAAACCGGAAGTTAAACAGAAGCCTGCATTCCAACAAAAGGGCAGATTACCATCATTACAAGA
TTTGAGACAGCCAAATACTACCGTGGAGAGAAAAGTATCCACTCAAACAATTTACCACAAAAGAAACCTGGATCAAATTAGCAAAAAGTGTTTGGTGGCGGT
GATGATAGTAGTAGTGAAGATGAAAGTAGTTCCAGTGATAGTTCAAGTGATGAAAGTGATTAA

Capítulo 2 - Artigos



Natalia Strohmayer <nastrohmayer22@gmail.com>

AMAB-D-18-01190 - Submission Confirmation

1 mensagem

AMB Editorial Office <em@editorialmanager.com>

17 de maio de 2018 16:18

Responder a: AMB Editorial Office <lemerjeid.brioso@springer.com>

Para: Natália Manuela Strohmayer Lourencetti <nastrohmayer22@gmail.com>

CC: ivanr.wolf@gmail.com, pri_lac@hotmail.com, valentegt@gmail.com, cleslei@yahoo.com, mariana@fcfar.unesp.br, gianninimj@gmail.com, fenguita@medicina.ulisboa.pt, ana.marisa@uol.com.brDear Dr Strohmayer Lourencetti,
Dear Co-Author(s),Your submission entitled "Transcriptional profile of a contaminant lineage of *Candida tropicalis* in bioethanol production" has been received by Applied Microbiology and BiotechnologyYou will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://amab.editorialmanager.com/>. (This applies to the corresponding author only.)The submission id is: AMAB-D-18-01190
Please refer to this number in any future correspondence.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Applied Microbiology and BiotechnologyPS: If there would be any concern regarding authorship, please contact the Managing Editor (Dr. Dorothea Kessler) at AMBoffice@gmx.deNow that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Transcriptional profile of a contaminant lineage of *Candida tropicalis* in bioethanol production

Natália Manuela Strohmayer Lourencetti¹; Ivan Rodrigo Wolf², Maria Priscila Franco Lacerda¹; Guilherme Targino Valente²; Ceslei Fernando Zanelli¹; Mariana Santoni¹; Maria José Soares Mendes Giannini¹; Francisco Javier Enguita³; Ana Marisa Fusco Almeida¹.

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil;

² São Paulo State University (UNESP), School of Agronomic Sciences, Botucatu, São Paulo, Brazil;

³ Lisbon University, School of Medicine Sciences, Lisbon, Portugal;

Abstract

The fermentation process is widely used in industry for the production of bioethanol and even though it is a widespread process, the problem of contamination by microorganisms is unknown. Problems of reduction in productivity are directly linked to nutrient competition when there are resulting crises of contaminations. Contaminant yeasts belonging to the *Candida* species are isolated. Elucidating the behavior that a contaminant manifests during the fermentation cycle is essential to combat it. In this sense, our study aims to study the functional and transcriptional behavior of the contaminating yeast of *Candida tropicalis* through sequencing techniques of global RNA (RNAseq-MiSeq) and the results showed a number of significantly expressed genes, both repressed and induced related to the fermentation process, such as sugar transport, pyruvate decarboxylase, amino acid metabolism, membrane resistance and also processes linked to transcription. Evidence that the contaminating yeast uses a whole machinery of fermentation routes, to produce bioethanol. However, we can suggest that *C. tropicalis* yeast is an important contaminant in the processes of alcoholic fermentation, having mechanisms of generation and resistance essential for the production of bioethanol. Based on their gene expression profile, many of these mechanisms are similar to *S. cerevisiae* strains currently used in bioethanol production.

Keywords: Bioethanol, Alcohol Fermentation, Contaminant, *Candida tropicalis*; RNA-seq

*Corresponding author: Ana Marisa Fusco Almeida

School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP)

Araraquara, São Paulo, Brazil - Rodovia Araraquara - Jaú Km 1, Postal code: 14800-903

Telephone number: +55 16 3301-4640/4637

Fax: +55 16 3322 0073

Email: ana.marisa@uol.com.br



Natalia Strohmayer <nastrohmayer22@gmail.com>

Submission Notification to co-author | BMS-CPPS-2018-2

1 mensagem

Current Protein & Peptide Science <cpps@benthamscience.org>

10 de abril de 2018 15:29

Responder a: Current Protein & Peptide Science <cpps@benthamscience.org>

Para: nastrohmayer22@gmail.com

Cc: cpps@benthamscience.org, nadiarazzaque@benthamscience.org

Dear Dr. Natália Lourencetti,

This is with reference to your article entitled: "Methodologies and applications of Proteomics for study of Yeast Strains: an update" which you have submitted for possible publication in Current Protein & Peptide Science, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Maria Priscila Lacerda who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as early as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Editorial Office
Current Protein & Peptide Science
Bentham Science Publishers

Note: For complaints contact: complaint@benthamscience.net

Abstract

Yeasts are one of the mostly used microorganisms as models in several studies. A wide range of applications in different processes can be attributed to their intrinsic characteristics. They are eukaryotes and therefore valuable expression hosts that require elaborate post-translational modifications. Its arsenal of proteins has become a valuable biochemical tool for the catalysis of several reactions of great value to the food (beverages), pharmaceutical and energy industry. Currently, the main challenge in systemic yeast biology is the understanding of the expression, function, and regulation of the protein pool encoded by such microorganisms. In this chapter, we will provide an overview of the proteomic methodologies used in the analysis of yeasts. Focusing on advantages and improvements in their most recent applications with an understanding of the functionality of the proteins of these microorganisms, as well as an update of the advances of methodologies employed in mass spectrometry.

Keywords: functional proteomics, quantitative proteomics, protein profiling, mass spectrometry, yeast



Natalia Strohmayer <nastrohmayer22@gmail.com>

Enc: Editor handles IJP-D-18-00206

1 mensagem

Junya de Lacorte Singulani <junyadelacorte@yahoo.com.br>
Responder a: Junya de Lacorte Singulani <junyadelacorte@yahoo.com.br>
Para: Natalia Strohmayer <nastrohmayer22@gmail.com>

7 de março de 2018 22:47

Oi Na,

Segue o email da submissão e o artigo em anexo

bjó

Junya

Em Quarta-feira, 31 de Janeiro de 2018 11:34, International Journal of Pharmaceutics <eesserver@eesmail.elsevier.com> escreveu:

Ms. Ref. No.: IJP-D-18-00206

Title: Potential of the association of dodecyl gallate to nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: in vitro and in vivo efficacy and toxicity
International Journal of Pharmaceutics

Dear Dr. Singulani,

Your submission entitled "Potential of the association of dodecyl gallate to nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: in vitro and in vivo efficacy and toxicity" will be handled by Editor Zhengrong Cui, Ph.D..

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ijp/>.

Your username is: junyadelacorte@yahoo.com.br


If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ijp/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Journal of Pharmaceutics

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

 **Manuscript Singulani et al_IJP.doc**
236K

12/04/2018

Gmail - Enc: Editor handles IJP-D-18-00206

Potential of the association of dodecyl gallate to nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: *in vitro* and *in vivo* efficacy and toxicity

Junya de Lacorte Singulani,^a Liliana Scorzoni,^a Natália Manuela Strohmayr Lourencetti,^a Luana Rossi Oliveira,^a Rosana Silva Conçolaro,^a Patricia Bento da Silva,^a Ana Carolina Nazaré,^b Carlos Roberto Polaquini,^b Marlus Chorilli^a Luis Octávio Regasini,^b Ana Marisa Fusco Almeida,^a Maria José Soares Mendes Giannini^{a,*}

*Corresponding author: Maria José Soares Mendes Giannini

School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP)

Araraquara, São Paulo, Brazil - Rodovia Araraquara - Jaú Km 1, Postal code: 14800-903

Telephone number: +55 16 3301-4641/4637

Fax: +55 16 3322 0073

Email: gianninimj@gmail.com/giannini@fcar.unesp.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis endemic in Latin America, caused by *Paracoccidioides* spp. The number of antifungal agents is restricted and the search for new compounds has increased. Additionally, nanostructured lipid system (NLS) appears to be an interesting strategy to carrier compounds for the treatment of mycosis. In this work, the antifungal efficacy and toxicity of dodecyl gallate (DOD) associated to a NLS was evaluated through *in vitro* and *in vivo* tests. DOD showed good *in vitro* antifungal activity and low toxicity in lung fibroblasts and zebrafish embryo, but no antifungal efficacy in infected mice, which may be due to its low bioavailability. On the other hand, the association of DOD to NLS was beneficial, resulting in lower toxicity in lung fibroblasts and zebrafish embryo. In addition, NLS+DOD promoted a significant reduction in the fungal burden of mice lung and could be a potential therapeutic option against PCM.

Keywords: *Paracoccidioides* sp., antifungal compound, lipid nanoparticles, *in vivo* models, systemic mycosis.

PUBLISHED BY

INTECH

open science | open minds

World's largest Science,
Technology & Medicine
Open Access book publisher



3,200+
OPEN ACCESS BOOKS



105,000+
INTERNATIONAL
AUTHORS AND EDITORS



110+ MILLION
DOWNLOADS



BOOKS
DELIVERED TO
151 COUNTRIES

AUTHORS AMONG
TOP 1%
MOST CITED SCIENTIST



12.2%
AUTHORS AND EDITORS
FROM TOP 500 UNIVERSITIES



Selection of our books indexed in the
Book Citation Index in Web of Science™
Core Collection (BKCI)

WEB OF SCIENCE™

Chapter from the book *Yeast - Industrial Applications*

Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/yeast-industrial-applications>

Interested in publishing with InTechOpen?
Contact us at book.department@intechopen.com

Phenotypic Characterization of Yeasts Aiming at Bioethanol Production

Natália Manuela Strohmayr Lourencetti,
Flávia Danieli Úbere, Maria Priscila Franco Lacerda,
Maria José Soares Mendes-Giannini,
Cleslei Fernando Zanelli,
Ana Marisa Fusco-Almeida and
Edwil Aparecida de Lucca Gattás

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70042>

Abstract

Worldwide, the production of bioethanol is derived through first-generation technology, where plants, vegetables, and cereals, that have high levels of sucrose, are fermented by yeast. Brazil, for the production of bioethanol from sugarcane, is among the world's leading producers. The process for bioethanol production is a complex that involves a variety of environmental factors, resulting in different phenotypic profiles of strain used. It has been evidenced that the interaction between environmental factors and microorganism can influence in the identification of different characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. Also, the bioethanol is developed by the second and third generations, and new yeast strains may also contribute to the feasibility of production. Successful performance of fermentation depends on the ability of the yeast to deal with a number of factors that occur during the fermentation, such as concentration of sugar, ethanol, nitrogen, pH, resistance to contaminants, stress protein, temperature change, and osmotic pressure.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol, phenotypic, characterization, resistance

1. Introduction

In recent decades, recurrent crises in world oil have resulted in serious economic crises, leading to the search for alternative fuels [1]. In 1930, Brazil presented the first National Congress

on Industrial Applications of Alcohol that was aimed at establishing the infrastructure for the production and use of bioethanol. This led Brazil to start production in the early twentieth century, while other countries started the production of fuel from grains, using its potential for bioenergy production. The remainder of residues with high protein content is a source of nutrition in agriculture, as well as being a rich source of sustainability [2].

The three major world powers producing bioethanol are Brazil (sugarcane), the USA (corn), and China (wheat and corn), where Brazil is the largest producer through a direct source of sugar, as production by grains requires an additional step with the liquefaction and hydrolysis of the starch. Estimates indicate that around 85% of all bioethanol worldwide is the responsibility of Brazilian and North American production, as well as inferior productions in all parts of the continents, as shown in **Figure 1** [3].

In Brazil, the bioethanol had low volume of consumption compared to the use of conventional fuels, maintaining the Brazilian dependence on imported oil [4]. This made the national government launch the National Alcohol Program (ProAlcool) in the 1970s, which established a new behavior for air quality and the development of technologies in the area of alternative sources of energy [5]. ProAlcool represented the largest increase in bioethanol production, from 500 million liters at the beginning of the program to about 13 billion liters per year [6]. Since then, Brazil has been characterized as a potential producer of bioethanol, with a well-developed domestic consumption policy [6, 7].

Currently, Brazil has an estimated bioethanol production with the 2016–2017 crops of 33.2 billion liters [8] and has kept that figure since 1986. All the production comes from sugarcane, representing a large-scale technology characterized by the development of new cane varieties,

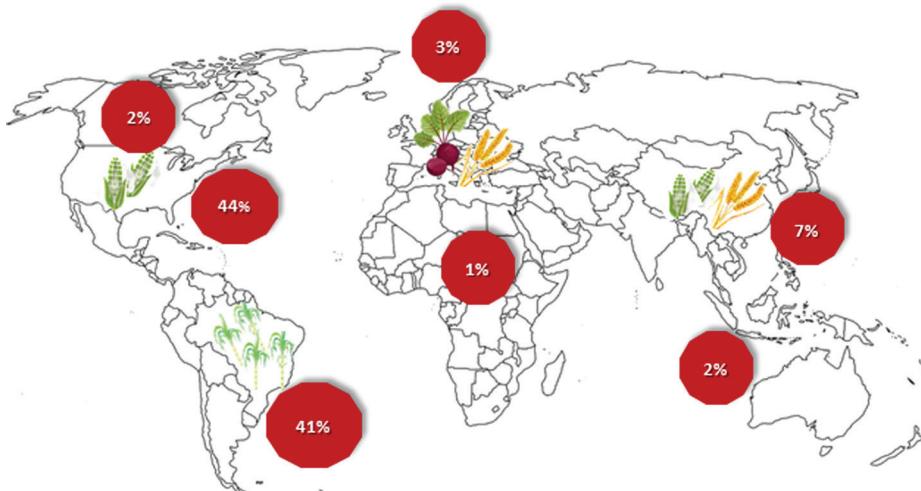


Figure 1. Global distribution of production and percentage of production per continent: Americas: South America—Brazil 43% (sugarcane); North America: USA 44% (corn) and Canada 2%; Europe 3% (vegetables and wheat); Africa 1% and Oceania 1%.

favorable climate, fertile soil, and advanced agricultural technologies [4, 6, 9]. The production of Brazilian bioethanol is derived from first-generation technologies, where a natural source of sugar from the sugarcane extraction, sucrose, is fermented by yeast with the primary product ethanol [10].

The sugarcane plant used for the Brazilian bioethanol production is derived the crossing from 637 species of the genus *Saccharum*, family *Poaceae*, *Andropogoneae* tribe, and native of hot temperate climate and with morphology characterized by stem and straw [11, 12]. The stem is the material from which the sugarcane juice is derived and is later used for the production of sugar and bioethanol. The bagasse is composed of all post-grind materials and the trash, characterized by the dry, green leaves of the plants, which serve as products of fermentation in second-generation processes for the formation of bioethanol [13].

The fermentation has been known since antiquity, being characterized as a biochemical and biological complex process, which has the objective of transforming sugar into ethanol (anhydrous and hydrated), carbonic gas, succinic acid, and volatile acids and esters [14].

The Brazilian fermentation process is differentiated and unique due to the fact that it is fed-batch in most states, being these short fermentation cycles and cell treatments with sulfuric acid [10]. This process uses cane juice as raw material, with a final product of 9–12% (v/v) and an efficiency of 90–92% [15]. The ratio of bioethanol produced to the amount of raw material used varies according to the amount of sugar present in the must, which consists of a mixture of molasses (sugar manufacturing residue), water, and sugarcane juice. The process starts with an action of invertase exoenzyme, in the process of breaking the sugar (sucrose, a disaccharide) into glucose and fructose (structural monosaccharides), which are absorbed by facultative aerobic microorganisms, which under anaerobic conditions form the pyruvic acid cycle, the enzymes pyruvate with the help of decarboxylase and alcohol dehydrogenase, producing the bioethanol and its subproducts at the end of the fermentation [9].

The main key of the national fermentation process is that, at each end of the fermentation cycle, the yeasts are subjected to a centrifugation and sulfuric acid wash in order to minimize the risk of contamination [10]. At the end of this treatment, the cells are returned to the fermenters as a new inoculum for the subsequent cycle, this stage being repeated twice daily throughout the crop for 6–9 months, during the year, as shown in **Figure 2** [16].

The fermentation with grains (the USA and China) is rich in carbohydrates so it is essential to the stage of liquefaction and hydrolysis of this raw material, where the molecules of starches are broken down into fermentable sugars, and thus fermentation can occur, as shown in **Figure 3** [17]. One of the main characteristics of the grain fermentations, besides the additional stage of liquefaction and hydrolysis of the starch, is that the mills do not use recycled yeast cells, like the Brazilian mills, which is due to the fact that the whole concentration of residues and fermentable products is retained for distillation, decreasing the fermentation process when compared to the cell recycle process [18].

Significant changes are also observed when comparing the Brazilian and North American fermentation processes. In the fermentation of sugarcane, we have a lower concentration of solid residues, a concentration of larger yeast cells, and a much shorter time for bioethanol

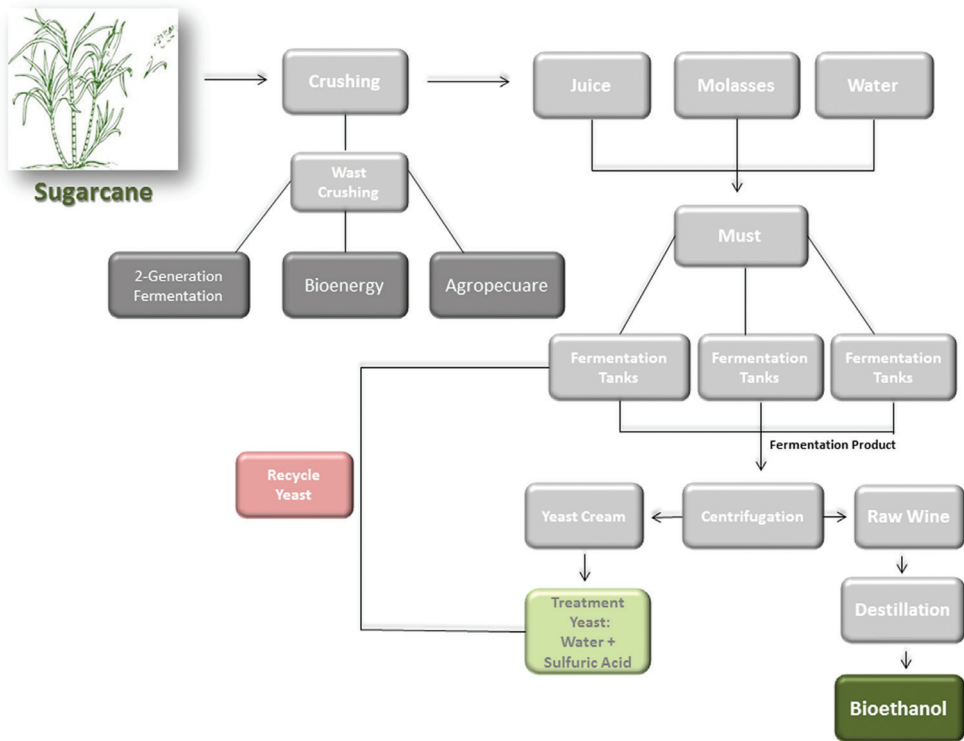


Figure 2. Simplified scheme of a fed-batch fermentation process with the recycling of yeast cells in Brazilian distillers by fermenting of sugarcane.

production, 6–12 h. The US process, that is derived for approximately 45–60 h, presents the advantages of a final concentration of bioethanol of 12–18%, against the 7–12% of the Brazilian process, and the raw material, that comes from corn plantations, lasts approximately one year, as opposed to the sugarcane harvest and its losses with rains that last around 200–240 day per year [19].

The main microorganisms used for the fermentation process are yeasts, such as *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., among others [13]. Currently, the most used yeast in the sugar and alcohol sector, for fermentation processes in the production of bioethanol is the specie *Saccharomyces cerevisiae* [20]. The methodologies used for the identification of yeasts based on morphology, biochemical characteristics, and sexual reproduction require the evaluation of 70–90 tests to obtain the identification of species. Macroscopic and microscopy features may be the first method of identification of *S. cerevisiae* yeasts, as presented in **Figure 4** [21, 22].

The molecular techniques have been developed as alternatives to traditional techniques for the identification and characterization of yeasts, with the advantage of building an independent expression of the genes that allows quick and accurate identification of yeast species [23].

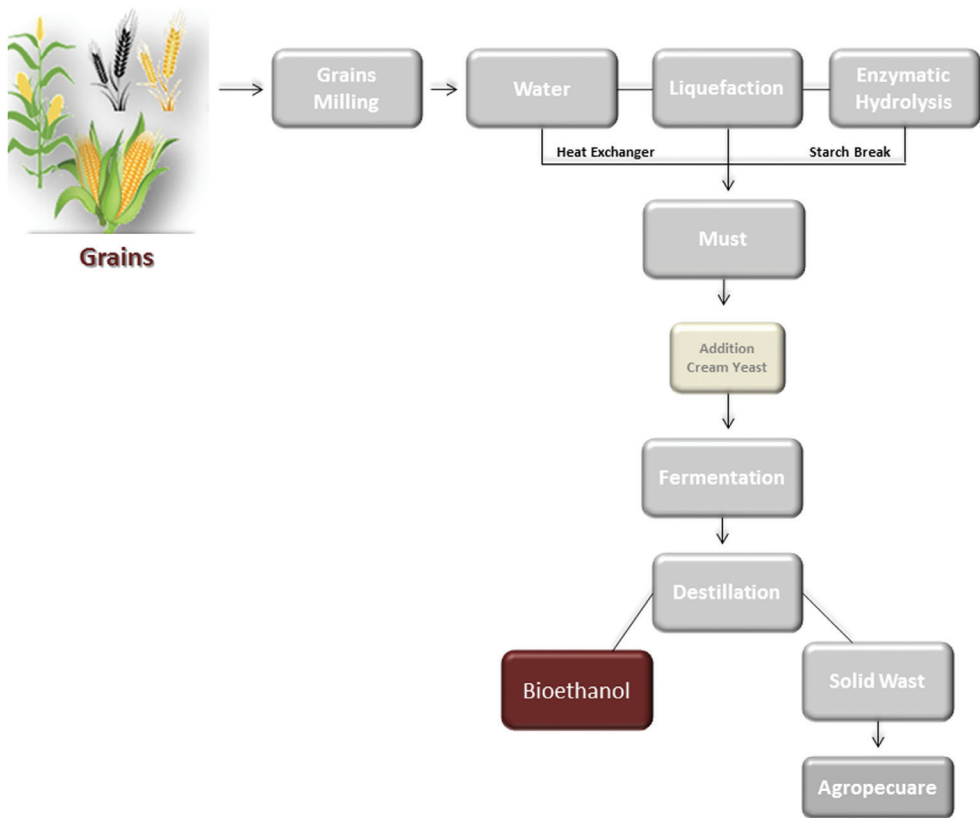


Figure 3. Simplified scheme of grains fermentation process with the liquefaction and hydrolysis in North American's and Chinese's distillers by fermenting of corns and wheat.

Due to the high mutation capacity of wild yeasts, molecular techniques for characterization and analysis of polymorphisms are being developed [24]. Genetic analyses of DNA, electrophoretic karyotyping, rRNA sequencing, rDNA restriction analysis, and polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) have been used as different tools to distinguish *Saccharomyces* sp. strains from strict sense group [25].

Studies of Melo Pereira [26] developed two new pairs of specific primers of the species, homologous to the HO gene of the species *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, and *Saccharomyces pastorianus*, offering a rapid method of PCR amplification, resulting in the correct identification of these species in less than 3 h. Guillamón [27] and Oliveira [28], by ribosomal DNA RFLP of ITS1, ITS2, and 5.8S identified different yeast species isolated from wine fermentation, and could also analyze the diversity of yeast species during spontaneous fermentation.

S. cerevisiae is characterized by being yeast with growth in media containing simple sugars and disaccharides, high genetic transformations, and qualities of high resistance to adverse

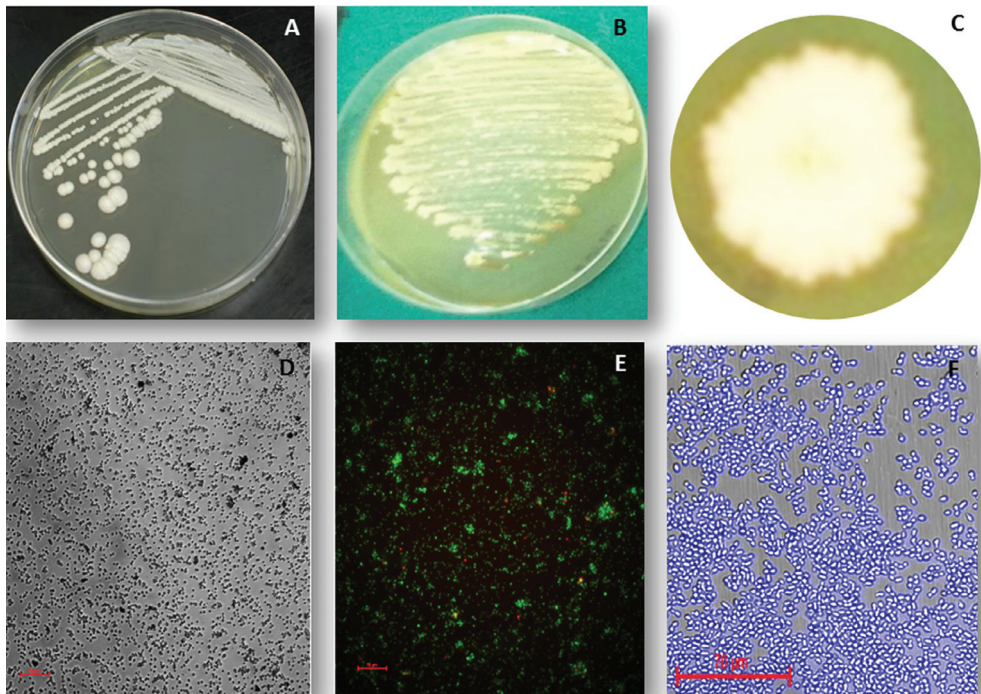


Figure 4. Macroscopic and microscopy of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. Macroscopies (A), (B), and (C) of PE-2 isolates, grown in YEPD (yeast extract-peptone-dextrose growth medium) solid with creamy and yellowish-white culture characteristics. Microscopies: (D) clear field microscopy of PE-2 isolate; (E) PE-2 isolate with FITC (fluorescein isothiocyanate fluoroforo) and Propidium Iodide cell tags; (F) PE-2 isolate with Calcofluor cellular target; Microscopy presence of oval yeasts with budding presence, with size of approximately 4–8 μm . Microscopies were performed in IN Cell Analyzer, objective of 20 \times and diameter 70 μm .

conditions of the growth medium, offering a primordial role in the processes of fermentation [29]. Some strains of *S. cerevisiae* have the capacity to be highly productive, dominating the entire fermentation process during the harvest period, allowing efficient and stable fermentations, which result in lower costs and higher fermentation performance (high production capacity of ethanol), and high viability throughout the process [30].

Studies indicate that *S. cerevisiae* is adaptable to different environments, revealing to be a rich source of phenotypic profiles in the *Saccharomyces* sp. species evolution [31, 32]. It has recently been shown that the interaction between environmental factors and organism may influence the identification of different specific characteristics of *S. cerevisiae* [33, 34]. *S. cerevisiae* is widely used and cultivated in industrial fermentation, due to the high capacity of the yeast adaptations to the variable conditions of the environment, such as sugar and ethanol concentrations, pH, oxygen concentrations, resistance to contaminants, salt stress, protein stress, temperature changes, and osmotic pressure [35].

According to Gao et al. [36], using thermophilic strains is interesting in the processes that involve simultaneous saccharification and fermentation (SSF), as this process may reach from

45 to 50°C, resulting in a greater bioethanol production. This occurs because the yeast suffers less damage with the temperature increase and there is a lower chance of microbial contaminations. It is therefore desirable that the thermostable yeast fermentation occurs at the optimum temperature of the enzyme, maximizing the ethanol production process. Thus, the increase in thermotolerance in yeast results in cost production, increases yield in the ethanol production with simultaneous saccharification and fermentation (SSF) system and reduces the possibility of contamination.

However, it is important to know the fermentative yeasts for the control and monitoring of alcoholic fermentation, especially in search of selected characteristics of dominance and resistance to bioethanol yeast production. The objective of this chapter is to distinguish the main phenotypic characteristics of *S. cerevisiae* yeasts in the alcoholic fermentation, for a possible selection of new strains with differentiated phenotypic characteristics, resistant and ideal for the production of bioethanol.

2. Phenotypic parameters of *S. cerevisiae* in alcoholic fermentation

2.1. Flocculation test

Cell flocculation of yeast strains such as *S. cerevisiae* is called cell aggregation and sedimentation in liquid media [37]. Cells have the characteristics of agglomeration at the end of each fermentation process, which makes it an interesting and divergent phenomenon in the industry, as shown in **Figure 5** [38]. Studies point out some divergences in flocculation, which can be a phenomenon of cooperative protection mechanism found in cells during adverse factors in the fermentation cycle [39]. It also facilitates the separation of yeasts at the end of the fermentation by sedimentation, thus helping the collection, centrifugation, and cellular treatment, contributing to the new inoculum stage, for a next cycle in the fermenter [40].

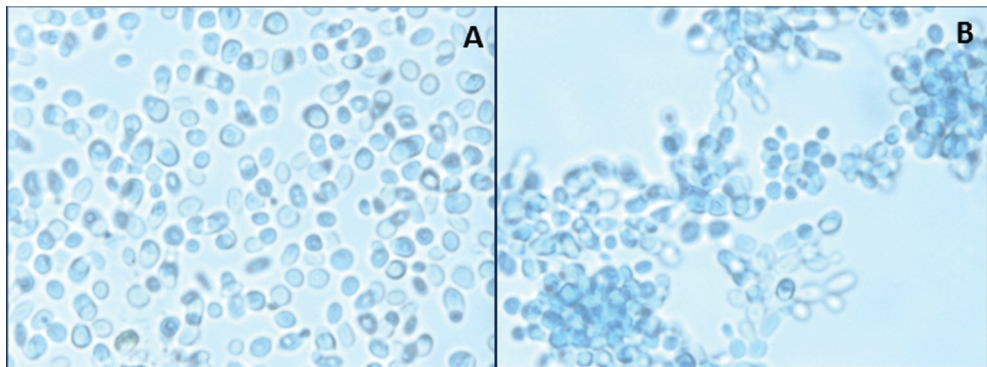


Figure 5. Characterization of aggregative power of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, grown in YEPD liquid medium and stained with lactophenol. (A) Cells in normal condition without aggregative power. (B) Cells in condition of cellular aggregation.

The principle of cell adhesion is initiated through the recognition of mannose chains, located on cell surfaces, by lectin-like proteins, and agitation is necessary for the beginning of flocculation [41]. Two hypotheses for flocculation are well established: (I) sensitively to proteinases; (II) inhibited by saccharides, suggesting the existence of a protein that recognizes these sugars [42].

These two hypotheses classify two flocculation groups in yeasts that are distinguished by the inhibition of sugar: the first group, called New Flo phenotype, characterized by the inhibition of mannose, glucose, maltose, and sucrose with the exception of galactose; and the second group, the Flo1, is inhibited by mannose, but not by glucose, maltose, sucrose, and galactose, and its action is normally bound to a gene [43].

It is believed that these two distinct phenotypes are caused by two different proteins of the lectin type. Furthermore, the physical-chemical interaction in the cells surface may be involved in the aggregation process, where there is a correlation between flocculation and electrophoretic mobility of yeast cells on certain stress conditions. Other studies reported the correlation of hydrophobicity in the process of flocculation [44].

Another hypothesis for flocculation is the action of a dominant gene family (FLO1, FLO5, FLO8, FLO9, FLO10, and FLO11), where they encode a yeast cell wall protein that acts directly on the cell aggregation [45]. The proteins encoded by these FLO genes share a cellular/modular organization in three domains: an amino-terminal responsible for carbohydrate binding, a central domain, and a carboxyl-terminal domain containing a glycosylphosphatidylinositol anchor sequence [46]. However, the central domain contains tandem repeat regions of DNA sequence that can drive recombination reactions within and between FLO genes, resulting in new generations of FLO alleles, thus conferring yeast cells a wide diversity in the flocculation phenomenon [47].

2.2. Sensitivity test temperature and ethanol

The environmental adversities occurring in a fermentation cycle, such as the decrease of nutrients by sugar consumption, temperature changes, pH changes, risk of contamination, phenolic compounds, and the concentration of ethanol by its own production occurs in different forms and some of them were completely studied [48]. An understanding of the cellular mechanisms of protection to the multiphysical and chemical stresses that the yeast undergoes during fermentation cycle is fundamental for the selection of ideal yeast [49].

Temperature elevations result in reduced fermentation efficiency in *S. cerevisiae*, due to the high fluidity in the membranes, caused by the altered composition of fatty acids in the adverse response [50]. As one of the stress factors known in the fermentative cycle in yeast, temperature change restricts ethanol production and induces the accumulation of proteins bound to tolerance stress [51].

In the first-generation fermentation cycle, yeasts require a temperature of 30°C, whereas, in the production of second-generation bioethanol, where cellulose enzymes start the process by saccharification, yeasts require a higher temperature of 45–50°C [52]. The efficacy of the

fermentation is decreased at high temperatures, because it causes damage to the yeast cell, such as the rupture of the protein structure or the loss of function, thus preventing cell proliferation, decreasing viability during the process, and leading to cell death [53]. This temperature control in the fermentative cycles is a problem for the plants in tropical countries, where the ambient temperature is already naturally high and cooling systems are necessary for the total control of this temperature [54].

In the bioethanol production, the process temperature must be stabilized at around 30°C (the cell growth temperature), which is reaching 40°C [55, 56]. Thus, thermotolerant yeast strains may be a promising approach to a profitable fermentation process, as is the case of simultaneous saccharification and fermentation that requires high temperatures to increase ethanol yield [36].

Osmotolerance can be an important factor in the production of ethanol for its adaptation strategy employed in all cell types by accumulating compatible solutes (sulfite), resulting in a decrease in the potential of intracellular water [57]. As sulphite and sulfite-generating compounds have long been used as antimicrobial agents in alcoholic fermentation, tolerance to sulfite in yeast is another desired characteristic for the production of bioethanol from sugarcane juice [58].

The high levels of ethanol in the fermentation medium are considered as negative parameters in the process conditions, because at the same time that the production is essential, the accumulation of ethanol by this production generates an acidification of the medium, leading to irreversible damages in the yeast membrane, thereby decreasing cell viability [59].

The true physiological and ecological relevance of ethanol tolerance in *S. cerevisiae* is its ability to generate mechanisms that protect the cell from chemical and physical damage at high levels of ethanol [60]; this is usually observed in a typical fermentation environment, where there is a large amount of sugars, leading later to ethanol production [30]. This stage generally occurs by stationary phase cells and its tolerance to the ethanol produced is only controlled by the integrity of the yeast membrane in contact with the ethanol accumulation, which is composed of chitin, glucans, glycoproteins, fatty acids, and ergosterol [61].

However, *S. cerevisiae* is resistant to ethanolic stress for its capacity of modifying the conformation of its membrane in the increase of fatty acids and ergosterol when coming in contact with the adverse environment, thus neutralizing the damages caused, mainly in relation to its viability [62, 63]. The accumulation of ethanol can also affect the structural compliance of the cellular proteins causing the inefficiency of its actions, such as the decrease of the activity of glycolytic enzymes: pyruvate kinase and hexokinase, besides altering the absorption of glucose, maltose, and amino acid. In some cases, there may occur cellular extravasation of essential cellular components [64].

In industrial fermentations, a high capacity of production is observed by the accumulation of ethanol in the medium, indicating a positive assimilation of residual sugar, which is measured by the visualization of cellular proliferation in the presence of the gradual levels of ethanol produced during the fermentative process [65]. Tolerance and ethanol characteristics of the main industrial strains of *S. cerevisiae* studied are described in **Table 1** [30, 66–69].

Strains	Group	Origin	Feedstocks	Temperature tolerance (°C)	Ethanol tolerance (%)
ZTW1	Industrial (fuel ethanol)	China	Grains	55	18
YJ5329	Industrial (fuel ethanol)	China	Grains	55	18
PE-2	Industrial (fuel ethanol)	Brazil	Sugarcane	40	15
CAT-1	Industrial (fuel ethanol)	Brazil	Sugarcane	40	15
AT-3	Industrial (fuel ethanol)	USA	Grains	40	14
ErOh red	Industrial (fuel ethanol)	USA	Grains	40	15

Table 1. Characteristics of temperature tolerance and ethanol for major industrial strains worldwide used for the production of bioethanol.

Although this assay is routinely used in industries as large-scale screenings, its actual importance in ethanol resistance in yeast is not elucidated, due to divergent of actions that this process can cause, for example, the negative side acting in the decrease of the cell viability, and positive the increase in resistance to contaminating microorganisms in the fermentation process [70].

The metabolic pathways correlated to the expression of genes responsive to high levels of heat stress and ethanol stress include heat shock proteins (HSPs) and also metabolic enzymes such as trehalose, which is directly involved in tolerance in *S. cerevisiae* [71]. HSPs play a role in folding and refolding, transport, and degradation of intracellular proteins, triggered by stress in fermentation process and located in the cytoplasm, nucleus, and mitochondria, acting immediately in response to an accumulation of denatured proteins, activating the transcription factors of thermal shock (HSF), and leading to a positive regulation of thermotolerance gene expression [72].

The interactions of multiple genes at loci for cellular functions under heat and ethanol stresses are essential [73]. HSPs are known as chaperones ensuring the functional and structural conformation of the yeast, on the action of genes such as SSA1, SSA2, SSA3, and SSA4 which are expressed together with the HSP genes HSP12, HSP26, HSP30, HSP31, and HSP150 which were also found active at high stress levels [74] and interactions between chaperones of different types are widely encountered [75].

However, the inference of several chaperones shows an effective activity in neutralizing the stress, with the activation of the functional chaperones specific to more complex structures in the yeast cell walls [76], which have as a main function to repair of these denatured proteins to maintain cell viability [77].

In addition to serving as chaperones, HSPs have numerous other functions, for example, Hsp30p is characterized as a hydrophobic plasma membrane protein that acts on the regulation of H⁺-ATPase, Hsp31p, and Hsp32p functions as hydrolases and peptidase, and Hsp150 is characterized as a protein in supporting the cell wall stability and remodeling [78]. HSPs and chaperone-mediated genomic regulation are also linked to glucose metabolism, which

are indispensable tools for stress tolerance in yeast metabolism, especially with storage of carbohydrates, such as trehalose [79].

Trehalose is a compound that acts to prevent the influx of excess salts resulting in irreversible dehydration of cells; therefore, yeasts are capable of accumulating trehalose up to 15% in a stress environment [80]. The trehalose acts by reducing the permeability of the membrane thereby rendering it hydrophobic, due to some regulatory genes such as TPS1, TPS2 and, TSL1, as well as acting in the remodeling of proteins under stress conditions [81]. Cells incapable of accumulating trehalose presented depreciated growth, leading to a significant decrease in cell viability during fermentation stresses [82].

2.3. Assimilation of sugars

Sugarcane juice is one of the main means used in the production of bioethanol, which is derived from the break of fermentable sugars such as sucrose, glucose, and fructose in contact with fermenting microorganisms such as yeast *S. cerevisiae* [83]. Yeast consumes the sugars in the medium in a complex and highly regulated manner, the principle of fermentation, where the sucrose is consumed first, followed by glucose and fructose, and finally maltose, this assimilation of sugars can occur simultaneously between the breaks of sugars, which is the standard process for sequential uptake of the glucose repression pathways or the catabolite repression pathway [84].

Glucose and sucrose may trigger beneficial effects on cells, including stimulation of cell proliferation, mobilization of storage compounds such as glycogen and trehalose, as well as decreased resistance to cell stress [85]. In contrast, negative impacts due to lack of glucose in the process can lead to several problems such as decreased or blocked fermentations, instability of cellular viability and low ethanol production [86], where the break of sugars, sucrose into simple sugars (glucose) occurs by an intracellular enzyme known as invertase, located in wall the yeast industries [87].

Microorganisms that possess the ability to assimilate the highest amount of sugars are indicated for the production of bioethanol, examples are shown in **Table 2** characterizing the main strains of *S. cerevisiae* worldwide used in industries for the production of bioethanol [30, 66–69].

Strains	Group	Origin	Feedstocks	Assimilation sugar (%)	Production bioethanol (%)
ZTW1	Industrial (fuel ethanol)	China	Grains	65	28
YJ5329	Industrial (fuel ethanol)	China	Grains	60	33
PE-2	Industrial (fuel ethanol)	Brazil	Sugarcane	51	22
CAT-1	Industrial (fuel ethanol)	Brazil	Sugarcane	52	26
AT-3	Industrial (fuel ethanol)	USA	Grains	42	18
ErOh red	Industrial (fuel ethanol)	USA	Grains	75	30

Table 2. Characteristics of the assimilation of residual sugars and ethanol production for large industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts used in the production of bioethanol.

The assimilation of sugars in the fermentation process is not exclusively the fermentation of sugarcane. Currently, new technologies are available to produce ethanol from vegetables such as potatoes, cassava, beets, cereals such as corn, and there are also studies showing the production of green bioethanol in algae fermentations [88].

This type of fermentation is due to the breakdown of starch, carried out by the action of the enzyme glucoamylase, acting directly on the conversion of starch to glucose, by breaking the successive bonds of the nonreducing end of the glucose finally producing straight chains [89]. The process of producing ethanol from starch involves two main steps: enzymatic hydrolysis as the main step and habitual fermentation as the second step [90].

2.4. Second-generation bioethanol

All adverse parameters studied for the first-generation fermentation process have been highly researched to reach an ideal model of production of second-generation bioethanol, which is characterized by being profitable and environmentally sustainable [91].

Second-generation bioethanol production starts from the lysis of the raw material (sugarcane bagasse, vinasse, and residues from the milling of grains). The main step is characterized by a pretreatment where the breakdown of the cellulose-hemicellulose-lignin complex allows the production of fermentable sugar levels for a subsequent fermentation, demonstrated in **Figure 6** [92].

The hydrothermal and lime pretreatments are the most used, known for making the method more effective in preparing the biomass bioconversion step [93], a strong advantage for the sugarcane bagasse. They can be carried out under conditions of low temperature and pressure, resulting in lower sugar degradation, whereas in the saccharification the pretreatment is observed with high temperatures and difficult breaks of carbohydrate chains, resulting in a lower amount of sugars [94].

The fermentation of lignocellulose hydrolysates for bioethanol production presents two main problems: first, the fermentation of xylose that requires a low and controlled oxygenation; second, the removal of microbial inhibitors, which can contaminate the process [95]. Furthermore, these yeasts present a certain tolerance limited to ethanol [96].

Genetic manipulation in the metabolism of xylose in yeast fermentation has advanced and pioneering studies on glucose transporters that mediate xylose uptake, allyl-xylitol-reductase genes, xylitol dehydrogenase and xylulokinase have been expressed, which allows a better assimilation and fermentation of xylose [97].

The main concern in this step is that the balanced supply of NADP (enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) and NADPH (enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) has to be constant to avoid the production of xylitol. The path is the reduction of NADPH production by blocking the oxidative pentose phosphate cycle in xylose assimilation [98]. Cellulose hydrolysates present different inhibitors from lignin derivatives and sugar degradation, resulting in high amounts of acetic acid, intrinsically necessary for the deconstruction of biomass [99].

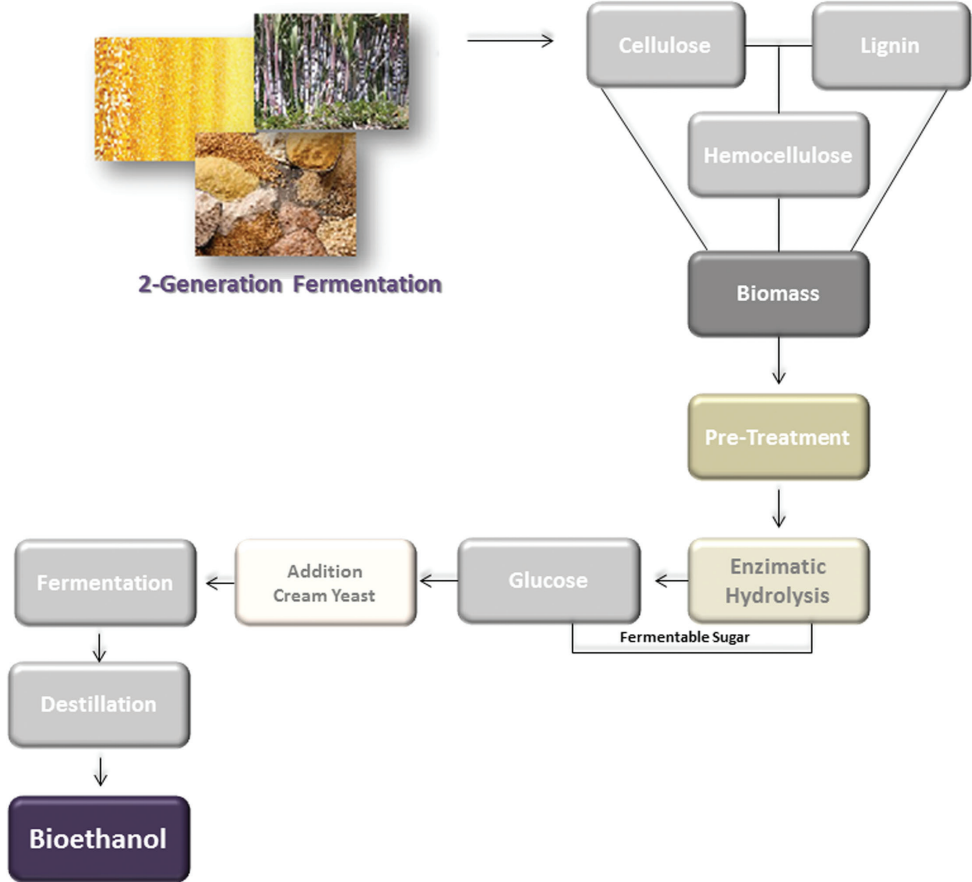


Figure 6. Simplified scheme of second-generation fermentation process with steps of biomass and hydrolysis for bioethanol production worldwide.

All adversities of typical fermentation first generation associated with pH, temperature, elevation of ethanol concentrations, and temperature among other stress factors present in large-scale fermentations are seen together in the adversity challenges of second-generation fermentation [100].

2.5. Advances and perspectives

First-generation fermentation over the years has mainly been used for large-scale industrial models. Although it is a well-established process, it is not definitively elucidated. Changes can be seen with each new process initiated presented for fundamental parameters and the behavior of the yeasts used.

S. cerevisiae has the characteristic of being adaptable to any environment, which leads to numerous behavioral responses during fermentation. As for each new cycle, changes are inevitable and checking all parameters of fermentation are of extreme importance for the success of the fermentation.

Flocculation is a divergent parameter, although it can have many advantages as a phenomenon of cellular protection to several stressors and contaminations in a process, it also presents disadvantages such as low yield in fermentation of fermenting tanks by their decanting. The question whether this phenomenon is beneficial or detrimental on flocculation is still uncertain; however, it is well-known and elucidated in its morphology or molecular action in yeast cells, and it contributes to the improvement of bioethanol production in the world industry.

For an alcoholic fermentation to be efficient, it is necessary and indispensable to know what happens throughout the process, the main steps and degrees that microorganisms go through for hours and days in order to remain viable and productive. For this reason, the study and knowledge of the two main parameters stress of fermentation (heat and ethanol) is of paramount importance for any beginning of the process, whether in small scale, as in laboratories, or large scale, as in industrial productions. The behavioral responses of the fermentation are measured through these parameters that are observed at all times, always aiming the improvement for the process.

The main step for a virtuous bioethanol production is the ability of the microorganism to breakdown the sugars and thus assimilate them to ferment. This detailed step has to be well studied so that there is no damage throughout the process, especially at industrial scales, so that both, a sufficient amount of microorganism concomitantly and adequate amount of sugars are essential to the start of the production.

Looking at the current scenario, the first-generation processes were modernized and studies and improvements resulted in second-generation fermentation, which aims to take advantage of all remaining residues and reaches to more sustainable processes. These processes are taking strides and improvements are being seen at all times to reach the ideal process.

In view of this profile, the search for yeasts with more robust characteristics in industrial lines is essential, and different strategies involving adaptation and functionality are highlighted by genetic engineering research. Advances in the area of a process and ideal yeast are positive, but the journey is still far from reaching perfection. The secrets and mysteries of fermentation are innumerable, but research is constantly revolutionizing and little by little these are being unraveled and the beginning of everything is the understanding of all the steps and all its parameters.

Acknowledgements

This study was financially supported by PADC-FCFAR UNESP and scientific agencies CAPES and CNPq.

Author details

Natália Manuela Strohmayer Lourencetti¹, Flávia Danieli Úbere², Maria Priscila Franco Lacerda¹, Maria José Soares Mendes-Giannini¹, Cleslei Fernando Zanelli³, Ana Marisa Fusco-Almeida¹ and Edwil Aparecida de Lucca Gattás^{2*}

*Address all correspondence to: edwilg@yahoo.com.br

1 Department Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil

2 Department Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil

3 Department Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil

References

- [1] Andrietta MGS, Andrietta SR, Steckelberg C, Stupiello ENA. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proálcool. *International Sugar Journal*. 2007;**109**:195-200
- [2] Scholey DV, Burton EJ, Williams PE. The bio refinery; producing feed and fuel from grain. *Food Chemistry*. 2016;**197**:937-942. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.11.063
- [3] Beltrade E, Vandenbergue LPS, Soccol CR, Sigoillot JC, Faulds C. First generation bioethanol. In: Soccol CR, Brar SK, Faulds C, Ramos LP, editors. *Green Fuels Technology*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. pp. 175-212
- [4] Amorim HV, Lopes ML, Oliveira JVC, Buckeridge MS, Goldman GH. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;**91**:1267-1275. DOI: 10.1007/s00253-011-3437-6
- [5] Macedo IC, Seabra JEA, Silva JE. Green house gases emissions in the productions and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*. 2008;**32**:582-595. DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.12.006
- [6] Zanin GM, Santana CC, Bon EP, Giordano RC, Moraes FF, Andrietta SR, Carvalho CC, Macedo IC, Fo DL, Ramos LP, Fontana JD. Brazilian bioethanol program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000;**86**:1147-1161. DOI: 10.1385/ABAB:84-86:1-9:1147
- [7] Goldemberg J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*. 2008;**1**:6-15. DOI: 10.1186/1754-6834-1-6
- [8] CONAB. Levantamento da safra 2016/17. 2017. Available from: www.conab.gov.br. [Accessed: 2017/01/20]

- [9] Amorim HV, Lopes ML. Ethanol production in a petroleum dependent world: The Brazilian experience. *Sugar Journal*. 2005;**67**:11-14. DOI: 20053116848
- [10] Brow NA, Castro PA, Figueiredo BCP, Savoldi M, Buckeridge MS, Lopes ML, Paullilo SCL, Borges EP, Amorim HV, Goldman MHS, Bonatto D, Malavazi I, Goldman GH. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS Yeast Research*. 2013;**13**:277-290. DOI: 10.1111/1567-1364.12031
- [11] Paes LAD, Oliveira MA. Potential trash biomass of the sugar cane plant. 2005; p. 19-23. In: Hassuani SJ, Leal MRLV, Macedo IC. Biomass power generation: sugarcane, bagasse and trash. Piracicaba, SP, Brazil. 2005
- [12] Canilha L, Chandel AK, Milessi TSS, Antunes FAF, Freitas WLC, Felipe MGA, Silva SS. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;**2**:1-15. DOI: 10.1155/2012/989572
- [13] Ensinas AV, Modesto M, Nebra SA, Serra L. Reduction of irreversibility generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy*. 2009;**34**:680-688. DOI: org/10.1016/j.energy.2008.06.001
- [14] Amorim HV. Ethanol Production in Brazil: a Successful History. *Proceedings of the Sugar Processing Research Conference*. 2006;**1**:44-47.
- [15] Basílio ACM, Araújo PRL, Morais JOF, Silva-Filho EA, Morais MA, Simões DA. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology*. 2008;**56**:322-326. DOI: 10.1007/s00284-007-9085-5
- [16] Barbrzadeh F, Jalili R, Wang C, Shokralla S, Pierce S, Robinson-Mosher A, Nyren P, Shafer RW, Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ, Davis RW, Ronaghi M, Gharizadeh B, Stambuk BU. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Molecular Genetics and Genomics*. 2012;**287**:485-494. DOI: 10.1007/s00438-012-0695-7
- [17] Christofolletti CA, Escher JP, Correia JE, Marinho, JF, Fontanetti CS. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*. 2013;**33**:2752-2761. DOI: 10.1016/j.wasman.2013.09.005
- [18] Ingledew WD, Austin GD, Kelsall DR, Kluhspies C. The alcohol industry: How has it changed and mature? In: Ingledew WM, Austin GD, Kelsall DR, Kluhspies C, editors. *The Alcohol Textbook. A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries*. Nottingham: Nottingham University Press; 2009. pp. 1-6
- [19] Martinez-Amezcuca C, Parsons CM, Singh V, Srinivasan R, Murthy GS. Nutritional characteristics of corn distillers dried grains with solubles as affected by the amounts of grains versus solubles and different processing techniques. *Poultry Science*. 2007;**86**:2624-2630. DOI: 10.3382/ps.2007-00137

- [20] Godoy A, Amorim HV, Lopes ML, Oliveira AJ. Continuous and batch fermentation process: Advantages and disadvantages of these process in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*. 2008;**110**:175-181
- [21] Deák T. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;**6**:287-292. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)89138-4
- [22] Karabıçak N, Uludağ Altun H, Karatuna O, Hazırolan G, Aksu N, Adiloğlu A, Akyar I. Evaluation of common commercial systems for the identification of yeast isolates in microbiology laboratories: A multicenter study. *Mikrobiyol Bul*. 2015;**49**:210-220. DOI: 10.5578/mb.9370
- [23] Bernardi T, Pereira G, Cardoso P, Dias E, Schwan R. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaca: Identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008;**24**:2705-2712. DOI: 10.1007/s11274-008-9799-y
- [24] Song HT, Liu SH, Gao Y, Yang YM, Xiao WJ, Xia WC, Liu ZL, Li R, Ma XD, Jiang ZB. Simultaneous saccharification and fermentation of corncobs with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of their microstructure during hydrolysis. *Bioengineered*. 2016;**7**:198-204. DOI: 10.1080/21655979.2016.1178424
- [25] Muller H, Annaluru N, Schwerzmann JW, Richardson SM, Dymond JS, Cooper EM, Bader JS, Boeke JD, Chandrasegaran S. Assembling large DNA segments in yeast. *Methods in Molecular Biology*. 2012;**852**:133-150. DOI: 10.1007/978-1-61779-564-0_11
- [26] de Melo Pereira GV, Ramos CL, Galvão C, Souza Dias E, Schwan RF. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. *Letters in Applied Microbiology*. 2012;**51**:131-137. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02868.x
- [27] Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*. 1998;**169**:387-392. DOI: 10.1007/s002030050587
- [28] Oliveira VA, Vicente MA, Fietto LG, Castro IM, Coutrim MX, Schüller D, Alves H, Casal M, Santos JO, Araújo LD, da Silva PH, Brandão RL. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaca production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;**74**:693-701. DOI: 10.1128/AEM.01729-07
- [29] Hector RE, Mertens JA, Bowman MJ, Nichols NN, Cotta MA, Hughes SR. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose requires gluconeogenesis and the oxidate branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. *Yeast*. 2011;**28**:645-660. DOI: 10.1002/yea.1893
- [30] Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. 2008;**8**:1155-1163. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x

- [31] Lidzbarrsky GA, Shkolnik T, Nevo, E. Adaptive response to DNA-damaging agents in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations from "Evolution Canyon", Mt. Carmel, Israel. *Plos One*. 2009;**4**:1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0005914
- [32] Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, Davey RP, Roberts IN, Burt A, Koufopanou V, Tsai IJ, Bergman CM, Bensasson D, O'Kelly MJ, van Oudenaarden A, Barton DB, Bailes E, Nguyen AN, Jones M, Quail MA, Goodhead I, Sims S, Smith F, Blomberg A, Durbin R, Louis EJ. Populations genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 2009;**458**:337-344. DOI: 10.1038/nature07743
- [33] Camarasa C, Sanchez I, Brial P, Bigely F, Dequin S. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: Evidence for origin-dependent metabolic traits. *Plos One*. 2011;**6**:1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0025147
- [34] Warringer J, Cubillos FA, Zia A, Gjuvsland A, Simpson JD. Trait variation in yeast is defined by population history. *Plos Genetics*. 2011;**6**:1-15. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002111
- [35] Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology*. 2008;**26**:89-105. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.002
- [36] Gao L, Liu Y, Sun H, Li C, Zha Z, Liu G. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015;**121**:599-606. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.11.002
- [37] Smit G, Straver MH, Lugtenberg BJJ, Kljne JW. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;**58**:3709-3714
- [38] Alvarez F, Correia LFM, Araújo TM, Mota BEF, Conceição LEFR, Castro IM, Brandão RL. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;**190**:97-104. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024
- [39] Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;**110**:1-18. DOI:10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x
- [40] Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vincens MD, Jansen A, Prevost MC, Latgé JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*. 2008;**135**:726-737. DOI: 10.1016/j.cell.2008.09.037
- [41] Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H. Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *Journal of Bacteriology*. 1998;**180**:6503-6510
- [42] Ma K, Wakisaka M, Sakai K, Shirai Y. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresource Technology*. 2009;**100**:2289-2292. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.010

- [43] Stratford M, Assinder S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*. 1991;**7**:559-574. DOI: 10.1002/yea.320070604
- [44] Beavan MJ, Belk DM, Stewart GG, Rose AH. Changes in electrophoretic mobility and lytic enzyme activity associated with development of flocculating ability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1979;**25**:88-95
- [45] Govender P, Domingo JL, Bester MC, Pretorius IS, Bauer FF. Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;**74**:6041-6052. DOI: 10.1128/AEM.00394-08
- [46] Goossens KV, Willaert RG. The N-terminal domain of the Flo11 protein from *Saccharomyces cerevisiae* is an adhesin without mannose-binding activity. *FEMS Yeast Research*. 2012;**12**:78-87. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00766.x
- [47] Goossens KV, Ielasi FS, Nookaew I, Stals I, Alonso-Sarduy L, Daenen L, Van Mulders SE, Stassen C, van Eijsden RG, Siewers V, Delvaux FR, Kasas S, Nielsen J, Devreese B, Willaert RG. Molecular mechanism of flocculation self-recognition in yeast and its role in mating and survival. *MBio*. 2015;**6**:1-16. DOI: 10.1128/mBio.00427-15
- [48] Della-Bianca BE, de Hulster E, Pronk JT, van Maris AJ, Gombert AK. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. *FEMS Yeast Research*. 2014;**14**:1196-1205. DOI: 10.1111/1567-1364.12217
- [49] Kitichantaropas Y, Boonchird C, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Auesukaree C. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. *AMB Express*. 2016;**6**:1-14. DOI: 10.1186/s13568-016-0285-x
- [50] Henderson CM, Zeno WF, Lerno LA, Longo ML, Block DE. Fermentation temperature modulates phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol levels in the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;**79**:5345-5356. DOI: 10.1128/AEM.01144-13
- [51] Ma M, Liu ZL. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;**87**:829-845. DOI: 10.1007/s00253-010-2594-2593
- [52] Liu ZH, Qin L, Zhu JQ, Li BZ, Yuan YJ. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2014;**7**:1-16. DOI: 10.1186/s13068-014-0167-x
- [53] Mejía-Barajas JA, Montoya-Pérez R, Salgado-Garciglia R, Aguilera-Aguirre L, Cortés-Rojo C, Mejía-Zepeda R, Arellano-Plaza M, Saavedra-Molina A. Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017;**205**:1-7. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.005
- [54] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013;**6**:1-9. DOI: 10.1186/1754-6834-6-151

- [55] Öhgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*. 2007;**42**:834-839. DOI:10.1016/j.procbio.2007.02.003
- [56] Basso LC, Basso TO, Rocha SN. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. *Biofuel Production*. 2011;**5**:85-100. DOI: 10.5772/17047
- [57] Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;**275**:290-300. DOI: 10.1074/jbc.275.12.8290
- [58] Linderholm AL, Findleton CL, Kumar G, Hong Y, Bisson LF. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;**74**:1418-1427. DOI: 10.1128/AEM.01758-07
- [59] Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;**109**:13-24. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- [60] Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006;**23**:85-202. DOI:10.1002/yea.1349
- [61] Dong SJ, Yi CF, Li H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015;**69**:196-203. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.10.025
- [62] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology*. 2007;**31**:535-569. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x
- [63] Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;**85**:253-263. DOI: 10.1007/s00253-009-2223-1
- [64] Zhao XQ, Bai FW. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 2009;**144**:23-30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.05.001
- [65] Kotarska K, Czupryński B, Kłosowski G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *Journal of Food Engineering*. 2006;**77**:967-971. DOI.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.041
- [66] Ruyters S, Mukherjee V, Verstrepen KJ, Thevelein JM, Willems KA, Lievens B. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015;**42**:39-48. DOI 10.1007/s10295-014-1544-y
- [67] Zhang K, Zhang L, Fang Y, Jin X, Qi L, Wu X, Zheng D. Genomic structural variation contributes to phenotypic change of industrial bioethanol yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS*. 2016;**16**:1-12. DOI: 10.1093/femsyr/fov118

- [68] Santos RM., Nogueira FCS, Brasil AA, Carvalho PC, Leprevost FV, Domont GB, Eleutherio ECA. Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. *Journal of Proteomics*. 2017;**151**:114-121. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.020
- [69] Della-Bianca BE, Gombert AK. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;**104**:1083-1095. DOI 10.1007/s10482-013-0030-2
- [70] Breisha GZ. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass Bioenergy*. 2010; **34**:1243-1249. DOI:10.1016/j.biombioe.2010.03.017
- [71] Jacob P, Hirt H, Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*. 2016;**10**:1-10. DOI: 10.1111/pbi.12659
- [72] Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. Biology of the heat shock response and protein chaperones: Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012;**76**:115-158. DOI: 10.1128/MMBR.05018-11
- [73] Zander G, Hackmann A, Bender L, Becker D, Lingner T, Salinas G, Krebber H. mRNA quality control is bypassed for immediate export of stress-responsive transcripts. *Nature*. 2016;**540**:593-596. DOI: 10.1038/nature20572
- [74] Mackenzie RJ, Lawless C, Holman SW, Lanthaler K, Beynon RJ, Grant CM, Hubbard SJ, Evers CE. Absolute protein quantification of the yeast chaperome under conditions of heat shock. *Proteomics*. 2016;**16**:2128-2140. DOI: 10.1002/pmic.201500503
- [75] Mokry DZ, Abrahão J, Ramos CH. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2015;**87**:1273-1292. DOI: 10.1590/0001-3765201520140671
- [76] Aslam K, Hazbun TR. Hsp31, a member of the DJ-1 superfamily, is a multitasking stress responder with chaperone activity. *Prion*. 2016;**10**:103-111. DOI: 10.1080/19336896.2016.1141858
- [77] O'Connell JD, Tsechansky M, Royall A, Boutz DR, Ellington AD, Marcotte EM. A proteomic survey of widespread protein aggregation in yeast. *Molecular BioSystems*. 2014;**10**:851-861. DOI: 10.1039/c3mb70508k
- [78] Needham PG, Patel HJ, Chiosis G, Thibodeau PH, Brodsky JL. Mutations in the yeast Hsp70, Ssa1, at P417 alter ATP cycling, interdomain coupling, and specific chaperone functions. *Journal of Molecular Biology*. 2015;**427**:2948-2965. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.04.010
- [79] Mahmud SA, Hirasawa T, Shimizu H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010;**109**:262-266. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.08.500
- [80] Tapia H, Koshland DE. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Current Biology*. 2014;**24**:2758-2766. DOI: 10.1016/j.cub.2014.10.005
- [81] Tapia H, Young L, Fox D, Bertozzi CR, Koshland D. Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. 2015;**112**:6122-6127. DOI: 10.1073/pnas.1506415112
- [82] Matsuda F, Kinoshita S, Nishino S, Tomita A, Shimizu H. Targeted proteome analysis of single-gene deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking enzymes in the central carbon metabolism. PLoS One. 2017;**12**:1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0172742
- [83] Inai T, Watanabe D, Zhou Y, Fukada R, Akao T, Shima J, Takagi H, Shimoi H. Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2013;**16**:591-594. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.015
- [84] Souza CS, Thomaz D, Cides ER, Oliveira KF, Tognolli JO, Laluce C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007;**23**:1667. DOI: 10.1007/s11274-007-9414-7
- [85] Koschwanez JH, Foster KR, Murray AW. Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. PLoS Biology. 2011;**9**:1-10. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001122
- [86] Lopes ML, Paulillo SC, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FH, Bernardino CD, Amorim Neto HB, Amorim HV. Ethanol production in Brazil: A bridge between science and industry. Brazilian Journal of Microbiology. 2016;**47**:64-76. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.003
- [87] Naumov GI, Naumova ES. Invertase overproduction may provide for inulin fermentation by selection strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 2015;**84**:130-134. DOI: 10.1134/S0026261715020095
- [88] Ivey M, Massel M, Phister TG. Microbial interactions in food fermentations. Annual Review of Food Science and Technology. 2013;**4**:141-162. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101219
- [89] Favaro L, Viktor MJ, Rose SH, Viljoen-Bloom M, van Zyl WH, Basaglia M, Cagnin L, Casella S. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. Biotechnology and Bioengineering. 2015;**12**:1751-1760. DOI: 10.1002/bit.25591
- [90] Fang Z, Deng H, Zhang X, Zhang J, Bao J. Evaluation of the cellulase cost during the cassava cellulose ethanol fermentation process. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2013;**29**:312-324
- [91] Li H, Shen Y, Wu M, Hou J, Jiao C, Li Z, Liu X, Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. Bioresources and Bioprocess. 2016;**3**:1-17. DOI: 10.1186/s40643-016-0126-4
- [92] Grimaldi MP, Marques MP, Laluce C, Cilli EM, Pombeiro Sponchiado SR. Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. Biotechnology for Biofuels. 2015;**8**:205. DOI: 10.1186/s13068.015.0384.y

- [93] Djajadi DT, Hansen AR, Jensen A, Thygesen LG, Pinelo M, Meyer AS, Jørgensen H. Surface properties correlate to the digestibility of hydrothermally pretreated lignocellulosic *Poaceae* biomass feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2017;**23**:1-15. DOI: 10.1186/s13068-017-0730-3
- [94] Choudhary J, Singh S, Nain L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2017;**123**:34-36. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.10.007
- [95] Miranda I, Masiero M. O, Zamai T, Capella M, and Laluce C. Improved pretreatments applied to the sugarcane bagasse and release of lignin and hemicellulose from the cellulose-enriched fractions by sulfuric acid hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2016;**91**:476-482. DOI: 10.1002/jctb.4601
- [96] Raghavi S, Sindhu R, Binod P, Gnansounou E, Pandey A. Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash. *Bioresource Technology*. 2016;**63**:495-409. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.062
- [97] Alff-Tuomala S, Salusjärvi L, Barth D, Oja M, Penttilä M, Pitkänen JP, Ruohonen L, Jouhten P. Xylose-induced dynamic effects on metabolism and gene expression in engineered *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-xylose cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;**100**:969-985. DOI: 10.1007/s00253-015-7038-7
- [98] Jeffries TW, Jin YS. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;**63**:495-409. DOI: 10.1007/s00253-003-1450-0
- [99] Ko JK, Um Y, Lee SM. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. *Bioresource Technology*. 2016;**222**:422-430. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.130
- [100] Moysés DN, Reis VC, de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;**17**:1-18. DOI: 10.3390/ijms1703020

INTECH

RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models

Ana Cerrejón Palanco¹, Junya de Lacorte Singulani¹, Caroline Barcelos Costa-Orlandi¹, Fernanda Patrícia Gullo¹, Natália Manuela Strohmayr Lourencetti¹, Paulo César Gomes¹, Gabriela Miranda Ayusso², Luiz Antônio Dutra³, Vanderlan da Silva Bolzani³, Luis Octávio Regasini², Maria José Soares Mendes-Giannini¹ & Ana Marisa Fusco-Almeida^{*1}

Aim: This work aimed to evaluate the activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* in planktonic and biofilm forms and their toxicity using alternative animal models. **Materials & methods:** Minimum inhibitory concentration and minimum fungicide concentration were determined. Biofilm formation and the susceptibility tests were performed by the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[carbonyl(phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide assay. Toxicity and efficacy were checked in *Danio rerio* and *Galleria mellonella* models. **Results:** The compound 3'-hydroxychalcone showed fungicidal activity against *C. gattii* in both planktonic and biofilm forms. The toxicity in zebrafish embryos revealed a low lethal concentration. In *G. mellonella*, the compound did not show antifungal activity and larvae toxicity. **Conclusion:** Because of the activity of 3'-hydroxychalcone against *C. gattii* *in vitro*, molecular modifications should be made to improve efficacy and to reduce toxicity *in vivo*.

First draft submitted: 9 April 2017; Accepted for publication: 16 June 2017; Published online: 6 September 2017

Cryptococcosis is an emerging disease caused by the species of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* is associated mainly with immunocompromised patients such as HIV-infected or those taking immunosuppressive drugs (patients with cancer, transplant recipients) [1]. Besides this, *C. gattii* affects immunocompetent individuals [2]. The yeast causes severe pneumonia and respiratory failure, and may affect the CNS, causing serious forms of meningitis and meningoencephalitis, which feature the most important and serious stage of infection [3]. *C. gattii* did not stimulate the migration of neutrophils *in vitro* and in a mouse model [4]. Furthermore, the fungi produce metabolites, especially dihydroxyacetone and acetoin, that can cause lower proinflammatory responses when compared with the metabolites produced by *C. neoformans*, promoting the survival and multiplication of fungi in the infected host [5,6]. These factors could explain why healthy people are more susceptible to this infection. In addition, the ability of *Cryptococcus* spp. to form a biofilm is considered as an important virulence factor and drug resistance that means it is becoming more difficult to treat the fungal infection [7,8].

KEYWORDS

- antifungal • biofilm
- chalcone • cryptococcosis
- *Galleria mellonella*
- zebrafish

¹School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

²Institute of Biosciences, Letters & Exact Sciences, UNESP – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

³Institute of Chemistry, UNESP – Araraquara, São Paulo, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 16 3301 4640/4641; Fax: +55 16 3322 0073; almeidaf@fcar.unesp.br

The treatment of cryptococcosis is initiated with the intravenous administration of amphotericin B (AmB), which binds to ergosterol in the fungal membrane, leading to cell lysis. Flucytosine can be used together with AmB with an intravenous or oral dose. Unfortunately, AmB and flucytosine are not generally available in regions where resources are limited and where the burden of disease is highest [9]. In the case of absence of flucytosine, fluconazole (FLZ) is the alternative agent to be used in combination with AmB. FLZ has inhibitory action on lanosterol 14 α -demethylase, which is responsible for the conversion of lanosterol to ergosterol, interrupting the ergosterol biosynthesis [10]. These drugs present toxicity and are associated with resistance development. In this context, the bioprospecting of natural products has become necessary in the search for a new antifungal [11].

Chalcones (*trans*-1,3-diaryl-2-propen-1-one) are precursors of open-chain flavonoids and isoflavones, which are abundant in plants. Chalcones and their analogs have increasingly attracted attention due to their numerous pharmacological activities as anticancer [12], antioxidant [13], antileishmaniasis [14], anti-inflammatory [15] and antifungal agents [16,17]. The target of chalcones is fungal enzymes, β (1,3)-glucan and chitin synthase, which catalyzes the synthesis of the major polymers of the fungal cell wall, β (1,3)-glucan and chitin, respectively [17].

The use of nonmammalian experimental models has grown in recent years because they are ethically more acceptable than the mammalian models. In this context, the early stages of the life of zebrafish (*Danio rerio*) have been proposed as an effective model for toxicity studies of new drugs [18]. Furthermore, larva of *Galleria mellonella* is a useful host for the study of various microorganisms, including fungi, and for the evaluation of commercial and new antifungal agents [19].

Therefore, this study aimed to verify the activity of the 3'-hydroxychalcone against two isolates of *C. gattii* in planktonic and biofilm forms as well as to check its *in vivo* toxicity and efficacy in alternative models.

Materials & methods

• Microorganisms

For this study, one veterinary isolate of *C. gattii* (*C. gattii* 118; isolate from a psittacine bird; AFLP6/VGII), previously tested with reduced susceptibility to FLZ [20], and the strain *C. gattii* ATCC

56990 (AFLP4/VGI; from The American Type Culture Collection) were used. All species were obtained from the collection of the Laboratory of Clinical Mycology, of the Department of Clinical Analysis of the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, Brazil.

• Compound & antifungal drugs

AmB and FLZ were obtained from the manufacturer (Sigma-Aldrich, MO, USA) and prepared according to the document M-27-A3, proposed by Clinical and Laboratory Standards Institute in 2008 [21]. 3'-hydroxychalcone (**Figure 1**) was synthesized by Claisen–Schmidt aldol condensation using protocols reported by our group in previous studies [22]. The structural identification of 3'-hydroxychalcone was established by NMR data analysis [23,24].

• Minimum inhibitory concentration (MIC)

Susceptibility tests of *C. gattii* (ATCC and isolate 118) to the 3'-hydroxychalcone, AmB and FLZ were performed according to the document M-27-A3 [21]. Inocula were prepared in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium (Sigma-Aldrich) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a pH of 7.0 using 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Sigma-Aldrich), in order to achieve a final concentration in microdilution plates of 2.5×10^3 colony forming units (CFU)/ml. As quality control, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was tested in the same concentration. Work solutions of FLZ and AmB were tested in concentrations ranged from 64 to 0.0625 μ g/ml and from 16 to 0.03 μ g/ml, respectively. For the 3'-hydroxychalcone, stock solution was prepared in DMSO and work solutions in RPMI medium. The range of concentration tested was from 0.48 to 250 μ g/ml. The plates were incubated at 37°C under agitation of 150 r.p.m. for up to 48 h. The readings were performed visually and confirmed using Alamar Blue[®] (Sigma-Aldrich). Three independent experiments were performed.

• Minimum fungicide concentration

A qualitative analysis of fungal viability was performed, by transferring a portion of the wells to a plate with Sabouraud agar (Difco Laboratories, MI, USA) and incubated at 37°C during 48 h. The minimum fungicide concentration was determined as the lowest concentration of the compound that did not allow the growth of

any fungal colony on the solid medium after the incubation period. A visual reading was performed [25]. Three independent experiments were performed.

• Biofilm formation

The biofilm formation was performed according to Martinez and Casadevall [26] for *C. neoformans*, with modifications. The ATCC strain and the veterinary isolate of *C. gattii* were cultivated in Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories) at 37°C, during 24 h with shaking at 150 r.p.m. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and counted at a hemocytometer, in order to obtain a final concentration of 1×10^8 cells/ml in PBS. About 100 μ l of the suspension was added into each well of 96-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), and the plates were incubated at 37°C without shaking for 5 h for the pre-adhesion stage. After this period, the wells were washed three-times with PBS to remove non-adhered cells, and 200 μ l of RPMI was added. The plates were incubated until 72 h in order to verify the ideal maturation time. All assays were carried out in triplicate.

• Biofilm metabolic activity

The metabolic activity of the biofilms in RPMI medium was checked by the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) reduction assay. After maturation, 50 ml of XTT solution (1 mg salt/ml in PBS) and 4 μ l of menadione solution (1 mM in acetone; Sigma-Aldrich) were added to each well. The plates were incubated at 37°C for 3 h. Spectrophotometric reading was taken at a wavelength of 492 nm. The RPMI 1640 medium free of biofilm formation was included as negative control [27].

• Susceptibilities of *C. gattii* biofilms to 3'-hydroxychalcone & antifungal drugs

For the susceptibility tests, *C. gattii* biofilms were formed in 96-well plates. The biofilms were washed, and 200 μ l of the work solutions of 3'-hydroxychalcone, AmB and FLZ in RPMI medium was tested in the following concentrations: 0.48–250, 0.5–256 and 1–512 μ g/ml, respectively. The plates were incubated at 37°C under shaking at 100 r.p.m. for 48 h more. After this period, the supernatant was removed, the cells were washed with PBS and the metabolic activities of the treated biofilms were measured

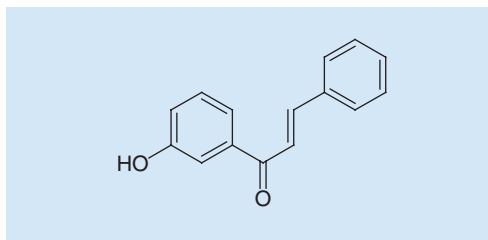


Figure 1. Structure of 3'-hydroxychalcone.

by the XTT reduction assay [27]. The sessile MICs (SMIC) were determined, representing 50% (SMIC₅₀) and 80% (SMIC₈₀) reduction of the metabolic activities, compared with the control wells (100%). At least three independent experiments were performed.

• Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy, biofilms were formed in 24-well plates until maturation as described by Martinez *et al.* with some modifications [28]. The communities were treated with amphotericin B (0.5 μ g/ml) and 3'-hydroxychalcone (62.5 and 31.25 μ g/ml) for 72 h. The cells were washed three-times with PBS and fixed with 1 ml of 2.5% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich) for 3 h. Then, the samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol from 50% to absolute ethanol at room temperature. Finally, drying was performed at room temperature. Before microscopic analysis, the samples were mounted on aluminum cylinders with silver (stubs) and placed on a high vacuum evaporator (Denton Vacuum, NJ, USA) for gold plating. The topographical characteristics of biofilms were analyzed by a scanning electron microscope (JEOL JSM-6610LV, MA, USA) [27].

• Embryotoxicity of 3'-hydroxychalcone in zebrafish

Zebrafish were raised according to standard protocols ($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with 14:10 day/night photoperiod). The fish were fed with live *Artemia salina* and dry flake. Zebrafish embryos used for chemical exposure were obtained from spawning adults in appropriate tanks overnight with the male/female ratio of 1:1, 1:2 or 2:1. Embryos were collected within 1–3 h post fertilization (hpf) and were transferred to 96-well plates (two embryos per well). Different concentrations of 3'-hydroxychalcone (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 16 μ g/ml) were tested in the static mode, and DMSO and embryonic medium (NaCl;

KCl; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were used as control. Stock solution of the compound was diluted in embryonic medium to make the concentration of DMSO 1% [29]. The plates were maintained at 28°C. The development status of zebrafish embryos and larvae was observed with a loupe (SteREO Discovery.V12, Carl Zeiss, Jena, Germany) at 6, 24 and 48 hpf, respectively [29,30]. Three independent experiments were performed.

• Infection, toxicity & efficacy in the *G. mellonella* model

Groups of 16 larvae with an average weight of 150 mg were placed in Petri plates plastic at 37°C in the night before the experiments. Fungal suspensions of *C. gattii* (ATCC 56990 and isolate 118) were prepared in PBS with 20 mg/l ampicillin in order to obtain a final concentration of 1×10^6 cells per larva. The last left proleg of the larvae was cleaned with 70% ethanol, and 10 µl of fungal suspensions was injected with a Hamilton syringe. Larvae infected with fungi were treated with 10 µl in the last right proleg with different doses of 3'-hydroxychalcone (2, 80 and 160 mg/kg). AmB (Sigma-Aldrich) at 2 mg/kg was used as a control. Also, uninfected larvae were treated with the compound to test the toxicity. All groups were incubated at 37°C for 7 days. The death of the larvae was assessed daily by visual inspection of the lack of movement. Three independent experiments were performed [31].

• Fungal burden in the *G. mellonella* model

Four larvae of each group infected with the fungi and treated with AmB or 3'-hydroxychalcone were collected at 48 h. Each larva was washed with 70% ethanol and cut into small pieces with a scalpel. Tissues were homogenized in 1 ml of PBS using a vortex mixer. Each sample was diluted 100× in PBS and 100 µl were plated on Sabouraud agar containing ampicillin.

The plates were incubated for 48 h at room temperature. After this period, the CFUs were counted [31].

• Statistical analysis

All data analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, CA, USA). The biofilm and fungal burden analyses were performed with analysis of variance with the Bonferroni post-test. Survival curves were analyzed using the log-rank (Mantel–Cox) test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

• Evaluation of antifungal activity

The results of the antifungal activity of 3'-hydroxychalcone are shown in **Table 1**. 3'-hydroxychalcone showed the best results for both ATCC strain (MIC = 1.9 µg/ml) and veterinary isolate (MIC = 0.96 µg/ml) of *C. gattii* when compared with FLZ (8 and >64 µg/ml, respectively). The veterinary isolate showed resistant to FLZ. AmB had a potent activity in *C. gattii*, with MICs ranging from 0.06 to 0.125 µg/ml. Regarding the test quality control, MIC values of FLZ and AmB in *C. parapsilosis* were according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, document M27-A3 [21]. Regarding the minimal fungicidal concentration, it was observed that 3'-hydroxychalcone had a fungicidal effect in both strains tested.

• Susceptibilities of *C. gattii* biofilms to 3'-hydroxychalcone & antifungal drugs

As FLZ is fungistatic, the reduction of 50% of the metabolic activities compared with untreated controls was considered (SMIC₅₀). For AmB and 3'-hydroxychalcone, for being fungicidal, the reduction of at least 80% of the metabolic activities compared with the controls

Table 1. Susceptibilities of *Cryptococcus gattii* to 3'-hydroxychalcone, fluconazole and amphotericin B.

Fungi	3'-hydroxychalcone		FLZ		AmB	
	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	1.930	3.875	8	16	0.125	0.031
<i>C. gattii</i> 118	0.960	0.960	>64	>64	0.0625	0.0625
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	125	125	8	8	1	0.5

AmB: Amphotericin B; FLZ: Fluconazole; MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimum fungicidal concentration.

was considered (SMIC₈₀). The metabolic activity of the veterinary isolate in the biofilm form treated with FLZ showed no reduction when compared with untreated control, indicating that the mature biofilm was resistant to this drug (SMIC₅₀ > 512 µg/ml; **Figure 2B**). This result was expected, since this isolate was also resistant to FLZ in the sessile susceptibility test. For the mature biofilm of *C. gattii* ATCC 56990, all concentrations were able to reduce the metabolic activities. However, only the concentration of ≥256 µg/ml reduced the metabolic activities of these biofilms in the established cut-off 50%, when compared with untreated control (SMIC₅₀ = 256 µg/ml; $p < 0.001$; **Figure 2A**). For AmB, all concentrations tested were able to damage the biofilms formed by ATCC strain (SMIC₈₀ = 0.5 µg/ml; $p < 0.001$; **Figure 2C**) and the isolate 118 (SMIC₈₀ = 0.5 µg/ml; $p < 0.001$; **Figure 2D**). The concentrations of 3'-hydroxychalcone of ≥62.5 µg/ml were able to reduce in at least 80% the metabolic activities of the *C. gattii* ATCC 56990 biofilm (SMIC₈₀ = 62.5 µg/ml; $p < 0.001$; **Figure 2E**). For the isolate 118, concentrations of ≥31.25 µg/ml reduced the metabolic activities of the biofilms in at least 80% (SMIC₈₀ = 31.25 µg/ml; $p < 0.001$; **Figure 2F**).

• Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was used to verify the damage of the treatment in the topography of the mature biofilms. **Figure 3A & D** represents the untreated mature biofilms of *C. gattii* ATCC 56990 and *C. gattii* 118. It is possible to observe a condensed group of cells in 3D conformation bound by one extracellular matrix (ECM) that they produce. **Figure 3B & E** represents the biofilms of the ATCC strain and the veterinary isolate treated with AmB 0.5 µg/ml, respectively. Severe damage was observed in all the extension of the biofilms. Even with the treatment it was still possible to observe a great amount of ECM covering the damaged biofilms. **Figure 3C & F** shows the same biofilms treated with 62.5 and 31.25 µg/ml of 3'-hydroxychalcone. Besides cell damage, a small amount of ECM was observed, indicating that the compound may also have acted in the destruction in the polysaccharide material.

• Toxicity of 3'-hydroxychalcone in zebrafish embryos

The evaluation of effects of 3'-hydroxychalcone on the development of zebrafish embryos was

performed at 6, 24 and 48 hpf, which represent different phases of embryonic development. The solvent DMSO 1% showed no toxicity to the embryo. Different concentrations of 3'-hydroxychalcone were tested in the range from 1 to 16 µg/ml. The toxic effect on embryonic development increases proportionally with the increase in concentration of the compound (**Figure 4**). In addition, the results revealed a lethal concentration 50% (LC₅₀) of 3.42 ± 0.46 µg/ml at 48 hpf. In **Figure 5A–C**, different stages of embryos with normal development (control), gastrula, pharyngula and early larvae, are shown. In **Figure 5D**, an embryo with an effect called coagulation, due to contact with the 3'-hydroxychalcone, at 16 µg/ml was observed. In **Figure 5E**, a development delay in comparison with control was shown, and in **Figure 5F** the embryo would have to be in pharyngula period, but did not pass the segmentation phase (3'-hydroxychalcone at 2 µg/ml).

• Toxicity & efficacy in the *G. mellonella* model

Larvae were infected with 1×10^6 cells per larva of *C. gattii* ATCC and the isolate 118 and treated with AmB at 2 mg/kg and 3'-hydroxychalcone at 2–160 mg/kg. The same doses were used to evaluate toxicity in larvae. The results showed that none of the compound dose tested was toxic, since there was a 100% of survival (data not shown). In **Figure 6**, *C. gattii* ATCC 59660 was more virulent than the isolate 118 for the larvae. The AmB treatment significantly increased the survival of larvae ($p < 0.05$) for the *C. gattii* ATCC 59660 strain, but not for the isolate 118. The treatment with 3'-hydroxychalcone showed no efficacy against *C. gattii* ATCC 59660 or the isolate 118 in the *G. mellonella* model in any of the tested doses.

• Fungal burden in *G. mellonella*

The fungal burden was determined by plating the larvae infected with *C. gattii* (ATCC and isolate 118) non-treated and treated with AmB (2 mg/kg) and 3'-hydroxychalcone (2–160 mg/kg; **Figure 7**). The AmB (2 mg/kg) treatment was effective in the reducing the fungal burden ($p < 0.05$). On the other hand, the 3'-hydroxychalcone treatment did not change the fungal burden when compared with the untreated group at the evaluated doses.

Discussion

There is a challenge for the pharmaceutical industry to establish innovative pharmacological

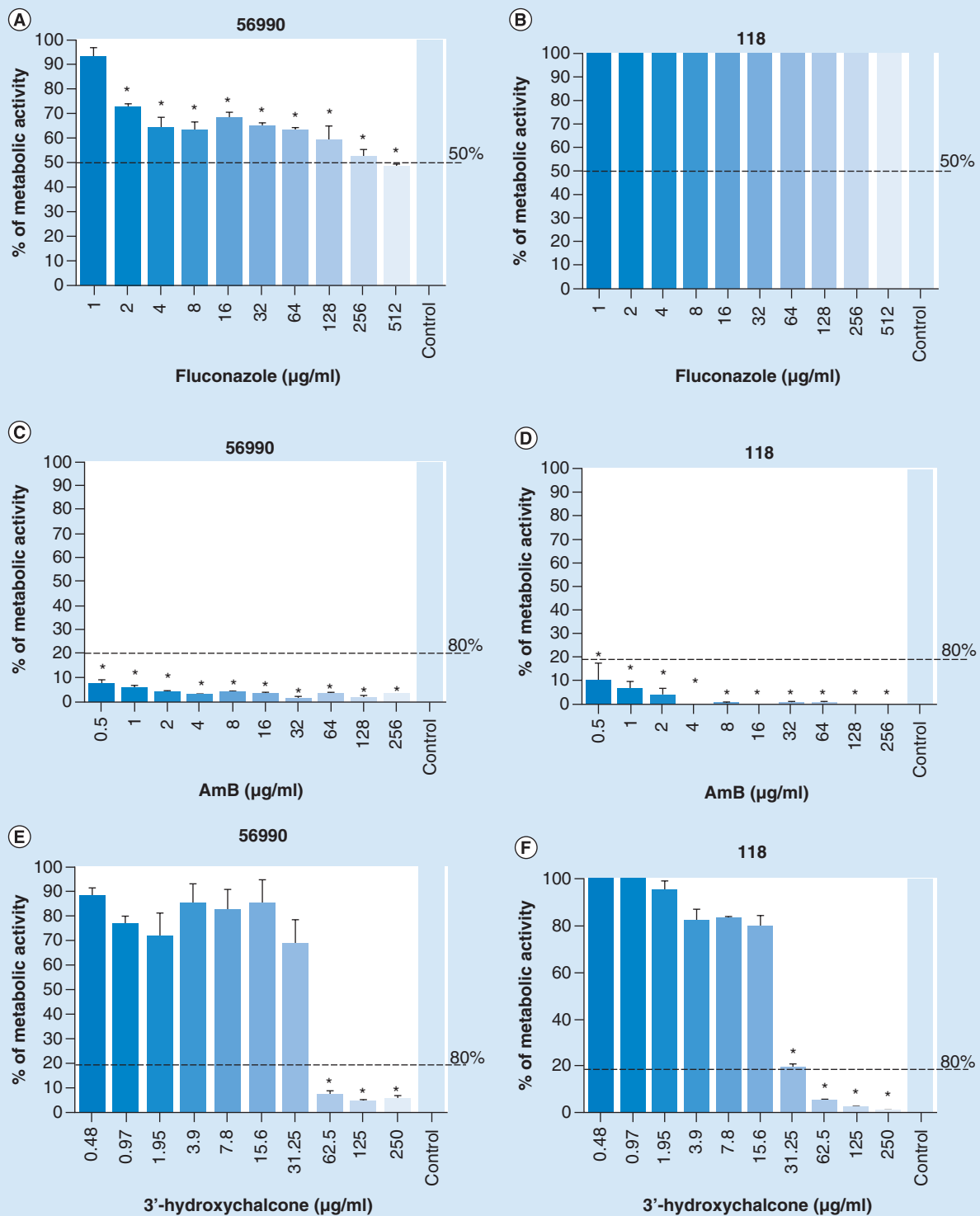


Figure 2. Susceptibilities of *Cryptococcus gattii* biofilms to fluconazole, amphotericin B and 3'-hydroxychalcone. Fluconazole was able to reduce the metabolic activities in at least 50% from the concentration of 256 µg/ml in *C. gattii* ATCC 56990 mature biofilms (A), while the mature biofilms formed by *C. gattii* 118 were resistant to all tested concentrations (B). For AmB, all concentrations from 0.5 µg/ml were able to reduce the metabolic activities in 80% in both *C. gattii* ATCC 56990 (C) and *C. gattii* 118 biofilms (D). The same was observed when the communities were treated by 3'-hydroxychalcone from the concentration of 62.5 µg/ml for *C. gattii* ATCC 56990 (E) and from the concentration of 31.25 µg/ml for *C. gattii* 118 biofilms (F).

*p < 0.001 versus control.

AmB: Amphotericin B.

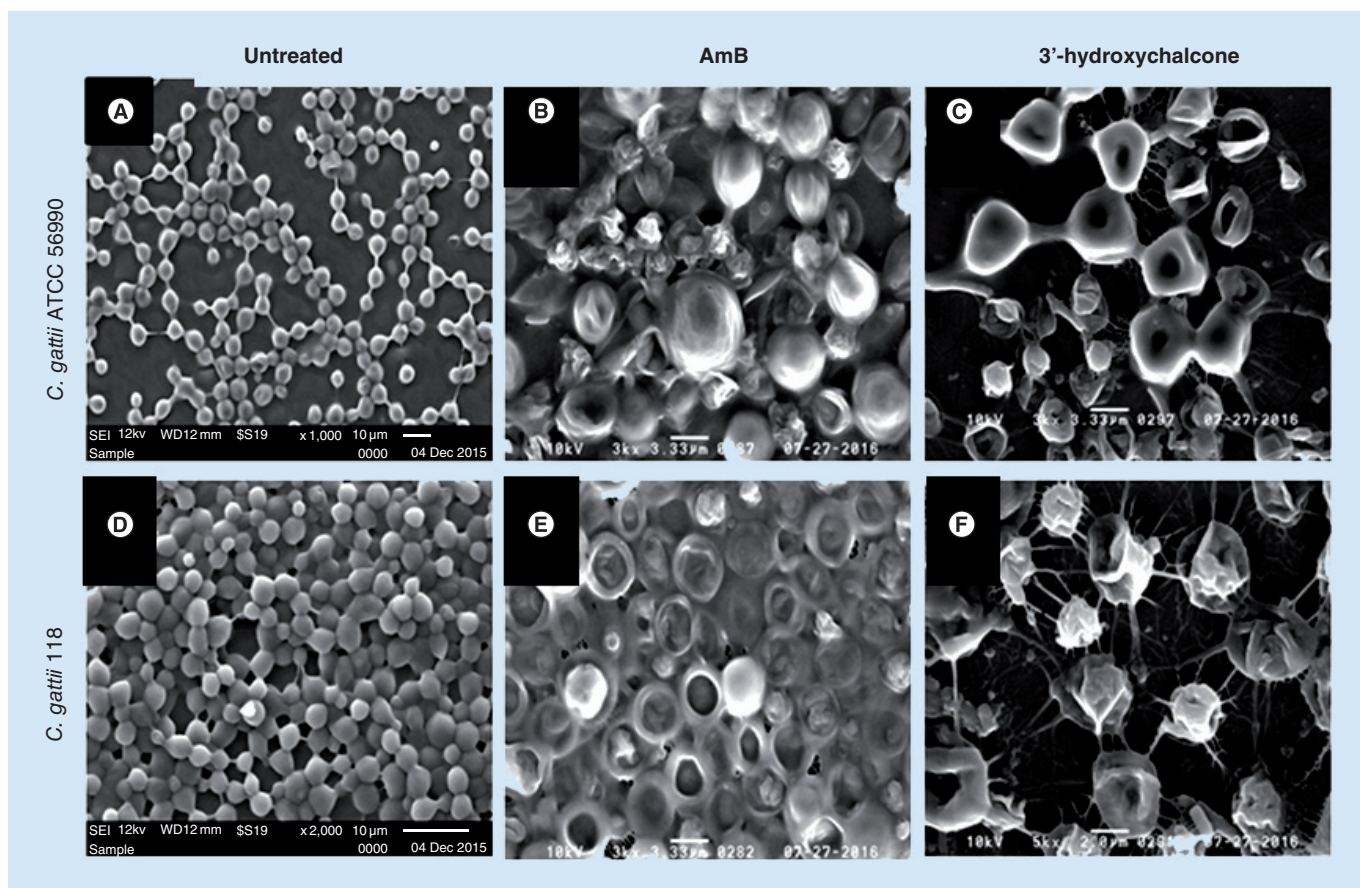


Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) of *Cryptococcus gattii* untreated and treated mature biofilms. Untreated biofilms of *C. gattii* ATCC 56990 and *C. gattii* 118, respectively (A & D). Damaged biofilms of the ATCC strain and the veterinary isolate treated with AmB 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (B & E). Extensive damage caused by treatment with the concentrations of 62.5 and 31.25 $\mu\text{g/ml}$ of 3'-hydroxychalcone in the communities of *C. gattii* ATCC 56990 (C) and *C. gattii* 118 (F). AmB: Amphotericin B.

targets for antifungal drugs, besides their high cost and risk [32–34]. In this scenario, studies involving the exploration of antifungal compounds emerge as alternative sources of new drugs, because of their greater efficiency, accessibility and lower toxicity. In this study, we used the compound 3'-hydroxychalcone to evaluate its antifungal activity against the ATCC 56990 strain and the veterinary isolate *C. gattii* 118.

Our results showed that the compound had a strong anti-*Cryptococcus* activity with the fungicide effect, like AmB. Previous studies evaluated the antifungal activity of a group of 21 chalcones against *Candida* spp., *C. gattii* and *Paracoccidioides brasiliensis*. The results showed the best MIC values for *P. brasiliensis* and no significant activity for *Candida* spp. [35]. Another study tested chalcones isolated from the fruits of a Kamala tree against several species of

Cryptococcus, *Aspergillus* and *Candida*. The compounds did not show activity against *Candida*, but had a good activity against *Aspergillus* and *C. neoformans* [36].

Biofilm formation represents a great problem in therapy, because the dose required to eradicate the biofilm may exceed the highest therapeutically permitted concentrations of the antifungal drug [37]. The antibiofilm activity of 3'-hydroxychalcone and the antifungal drugs FLZ and AmB were also verified in this study. The results showed that biofilms formed by the veterinary isolate were resistant to FLZ. Those formed by the reference strain were susceptible only at higher concentrations of this drug. However, AmB and 3'-hydroxychalcone were able to reduce more than 80% the metabolic activity of the treated biofilms in all concentrations of AmB tested and in concentrations

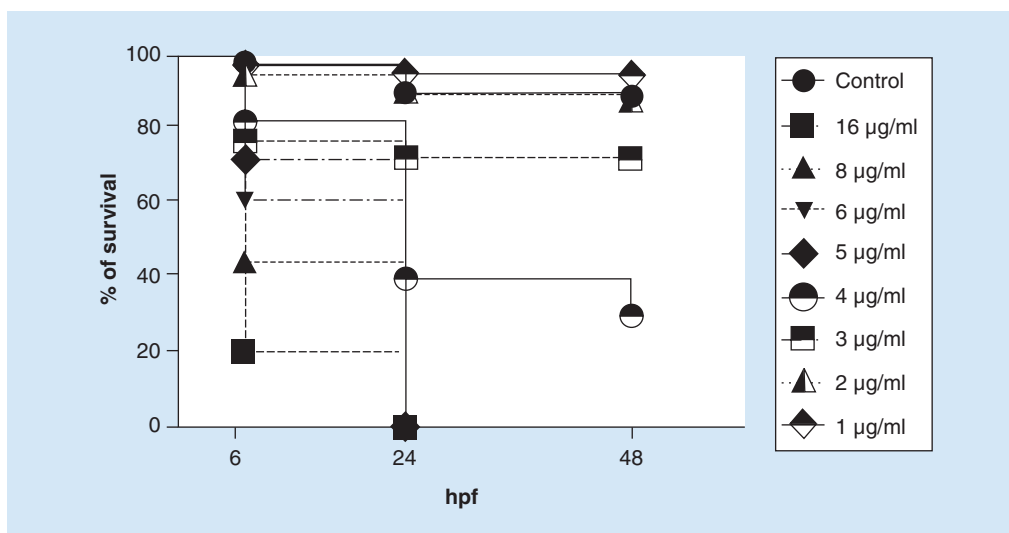


Figure 4. Survival curve of zebrafish embryos in contact with different concentrations of 3'-hydroxychalcone 6, 24 and 48 h post fertilization.

hpf: Hours post fertilization.

higher than or equal of 31.25 µg/ml for the compound. A study conducted by Martinez & Casadevall confirmed the resistance of *C. neoformans*' biofilms to azoles and the high susceptibility to AmB [26]. Thus, 3'-hydroxychalcone may be a promising compound against fungal biofilm. Other studies have been performed trying to find new ways to combat biofilms of *Cryptococcus* spp., such as chitosan [28],

ethylenediaminetetraacetic acid [38], antifolate drugs [39] and antituberculosis drugs, isoniazid and ethionamide alone and combined with itraconazole and FLZ [8].

In vivo experiments involving zebrafish are gaining popularity. The use of zebrafish embryos as a model for toxicity substantially reduces test time and costs compared with rodent and rabbit tests. In addition, the high fecundity of

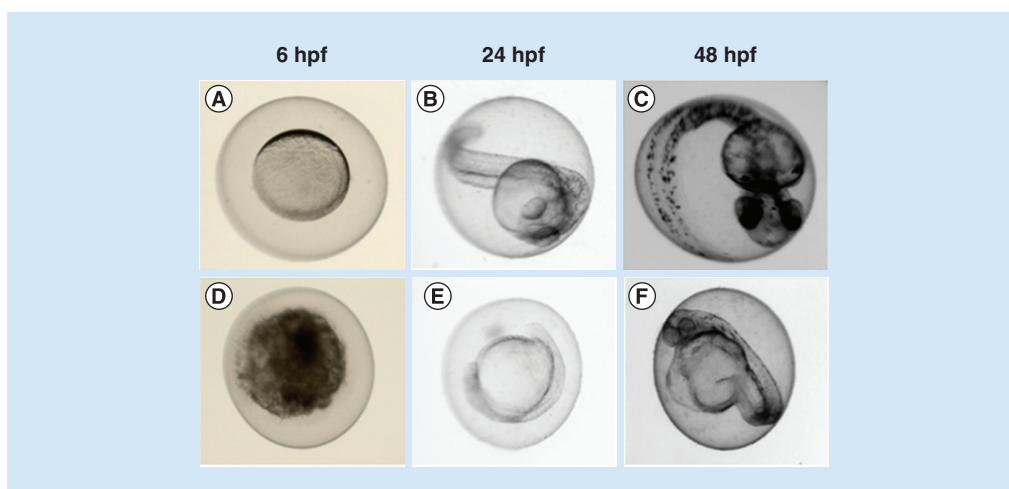


Figure 5. Representative images of the embryonic development of zebrafish. Control embryos showing normal development (A–C). Embryos treated with 3'-hydroxychalcone at 16 µg/ml presenting coagulation (D) and treated with 3'-hydroxychalcone at 2 µg/ml presenting delayed development (E & F).

hpf: Hours post fertilization.

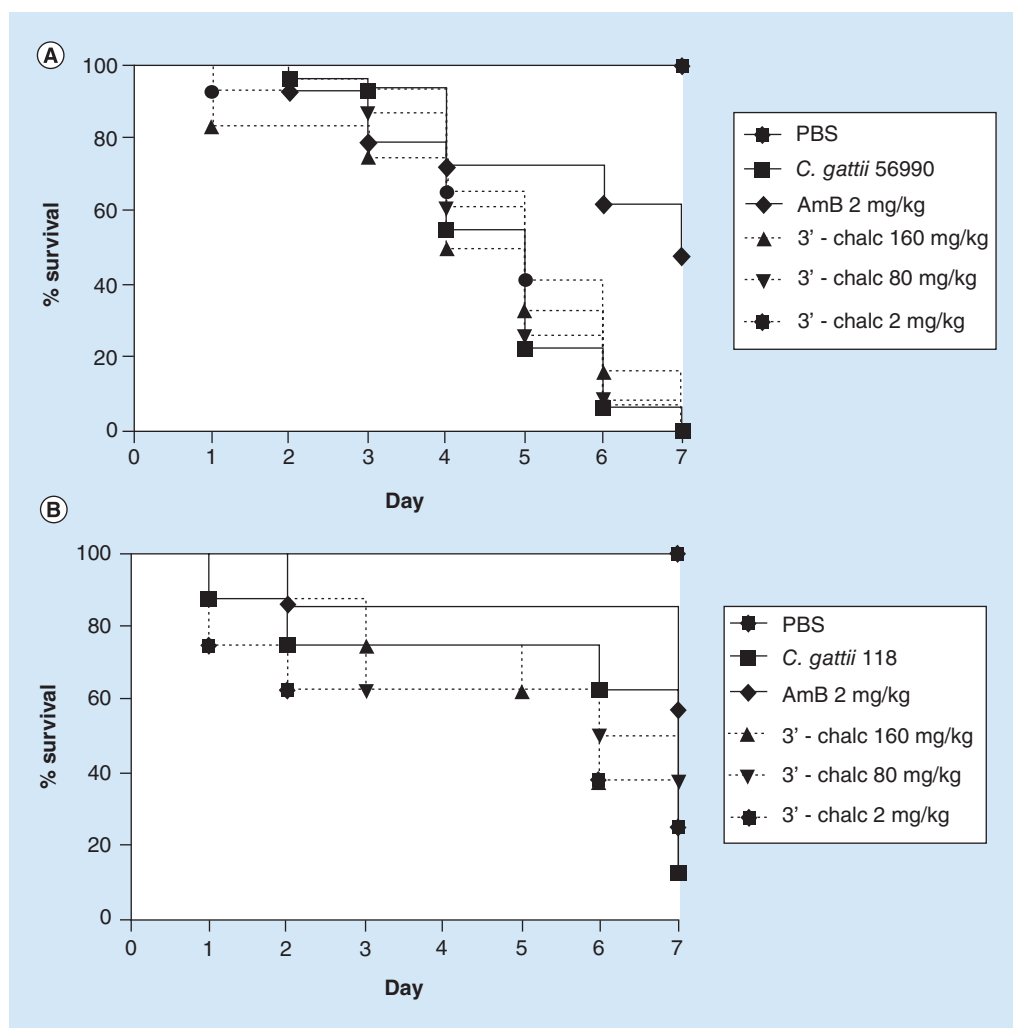


Figure 6. Effect of antifungal treatment in survival of *Galleria mellonella* larvae infected with 1×10^6 cells per larva of *Cryptococcus gattii*. Survival curve of *G. mellonella* larvae infected with *C. gattii* ATCC 56990 (A) and *C. gattii* isolate 118 (B) and treated with amphotericin B (AmB 2 mg/kg) or 3'-hydroxychalcone (3'-chalc 2, 80 and 160 mg/kg).

AmB: Amphotericin B; PBS: Phosphate-buffered saline.

adult fish, the small size and transparency of the embryos are great advantages of the model [40]. In this context, the toxicity of the 3'-hydroxychalcone was evaluated in zebrafish embryos. At 6 hpf, only the two highest concentrations of 3'-hydroxychalcone affect more than 50% of the embryos. At 24 hpf, besides these concentrations, the concentrations of 6 and 5 $\mu\text{g/ml}$ caused 100% of embryo mortality. At 48 hpf, the results were similar to those of 24 hpf. Therefore, 24 hpf is the period more susceptible to damage. In this period, there is rapid differentiation of organs and extensive cell proliferation, which create particular teratogenic factors enabling structural defects [41]. The effects of 3'-hydroxychalcone

on the development of zebrafish embryos were examined at concentrations around the MIC. The value of LC_{50} obtained is higher than the ideal concentration used to isolate 118 (MIC 0.96 $\mu\text{g/ml}$), but is close to the concentration required for inhibition of the *C. gattii* ATCC strain (MIC = 3.875 $\mu\text{g/ml}$). Thus, molecular modifications in 3'-hydroxychalcone structure may be necessary to reduce its *in vivo* embryotoxicity.

Regarding the alternative *G. mellonella* model, before starting the treatment of infected larvae, the toxicity assay of the compound was performed in order to check the survival of larvae. The 3'-hydroxychalcone at 2, 80 and 160 mg/kg

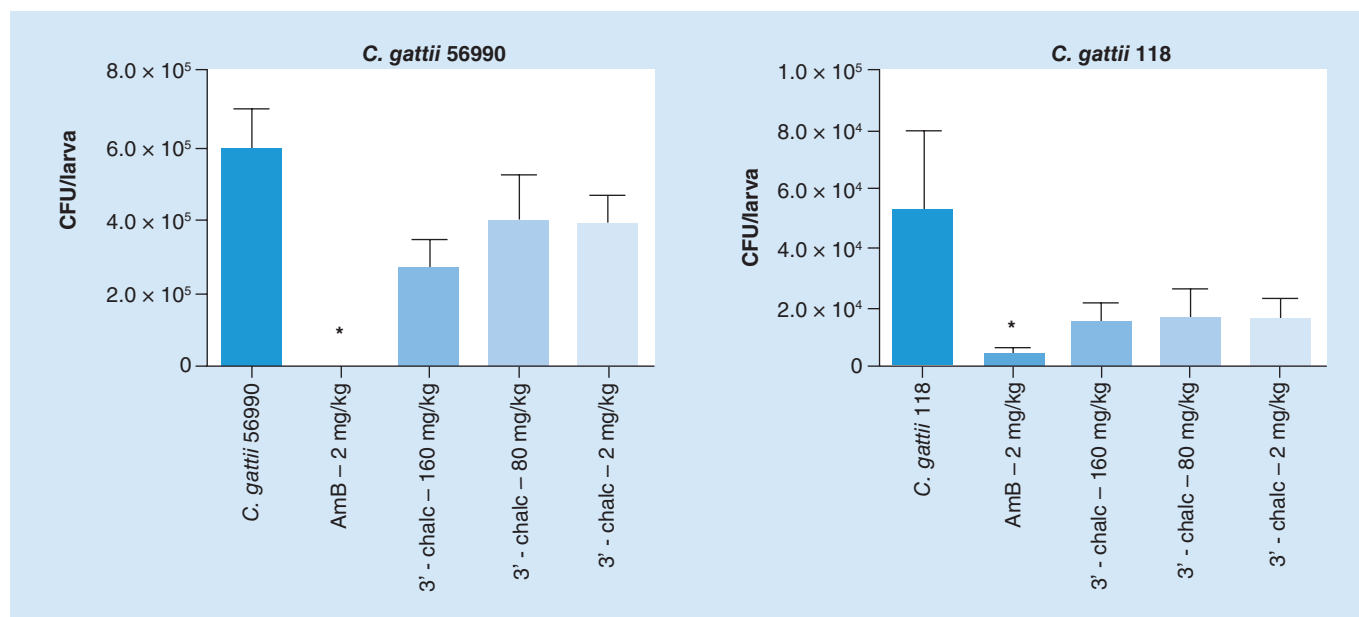


Figure 7. Effect of antifungal treatment in fungal burden of *Galleria mellonella* larvae infected with 1×10^6 cells per larva of *Cryptococcus gattii*. $p < 0.05$ versus control (*C. gattii* ATCC or 118).

3'-chalc: 3'-Hydroxychalcone; AmB: Amphotericin B; CFU: Colony forming units.

was not toxic to the model. After checking the toxicity, the larvae were infected with 1×10^6 cells per larva of *C. gattii* ATCC 56990 or *C. gattii* 118, following by the treatment with AmB (2 mg/kg) and 3'-hydroxychalcone (2, 80 and 160 mg/kg). The ATCC strain was more virulent than *C. gattii* isolate 118. Studies of different strains of *C. gattii* in *G. mellonella* have shown that virulence is not specifically associated with a molecular type of *C. gattii*, but relies heavily on individual attributes of the strain [42]. Regarding the effect of 3'-hydroxychalcone, there is no correlation between the *in vitro* and *in vivo* activities in this study. This fact could be explained by the low aqueous solubility of this hydrophobic compound leading to difficulty in its distribution from biofluid to organs in the animal models and consequently no antifungal activity is observed. The same occurred with other compounds proposed as antifungal agents in other studies [43,44]. In these cases, molecular modifications that make the molecule more hydrophilic are proposed.

Conclusion & future perspective

The development of new antifungal agents to overcome biofilm drug resistance is a challenge. Our *in vitro* tests showed that the 3'-hydroxychalcone was potent against *C. gattii*, including in the biofilm form, and can be considered as a

promising antifungal compound. In addition, there is good evidence to suggest that the use of zebrafish and *G. mellonella* is useful, facile and inexpensive models to evaluate toxicity and efficacy of antifungals. Consequently, they can contribute to reduce the number of mammals during experimentation. In this study, these alternative animal models were used to evaluate 3'-hydroxychalcone. In zebrafish embryos, this compound showed to be toxic in concentrations close to the MIC. In *G. mellonella*, the compound showed no toxicity, but did not protect the larvae from infection with either *C. gattii* strains. Thus, because of their good activity against *C. gattii* *in vitro*, further molecular modifications should be made to 3'-hydroxychalcone to improve the results *in vivo*, which should include reduction of hydrophobicity.

Financial & competing interests disclosure

This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADC-UNESP; Grant No.: 2014/15-1, súmula 230), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Grant Nos.: 2014/10446-9, 2015/003700-9 and 2014/18330-0), Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Grant Nos.: 403586/2012-7, 471129/2013-5, 141073/2012-8 and

150261/2016-0). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

SUMMARY POINTS

- Biofilm formation by *Cryptococcus* spp. generates a big problem of resistance to conventional antifungals.
- Chalcone and its derivatives have increasingly attracted attention due to numerous pharmacological activities as anticancer, antioxidant, leishmanicidal, anti-inflammatory and antifungal.
- Alternative animal models are rapid, facile and inexpensive compared with mammal models.
- Zebrafish is an alternative animal model for verifying the toxicity of natural and synthetic compounds.
- *Galleria mellonella* is an alternative animal model used for parasite–host interaction studies and antifungal testing.
- 3'-hydroxychalcone is a promising compound for treatment of cryptococcosis, being fungicide to cells in biofilm.
- In zebrafish embryo, 3'-hydroxychalcone presented toxicity at close minimum inhibitory concentrations to fungi.
- In *G. mellonella*, 3'-hydroxychalcone showed no efficiency in the infection against *Cryptococcus gattii*, but was not toxic to larvae.
- Molecular modifications should be made to 3'-hydroxychalcone to improve *in vivo* results and to demonstrate its promising effects as a novel antifungal against *C. gattii*.

References

Papers of special note have been highlighted as:
• of interest

- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23(4), 525–530 (2009).
- MacDougall L, Fyfe M, Romney M, Starr M, Galanis E. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 17(2), 193–199 (2011).
- Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Pulmonary cryptococcosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32(6), 727–734 (2011).
- Dong ZM, Murphy JW. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect. Immun.* 63(7), 2632–2644 (1995).
- Wright L, Bubb W, Davidson J *et al.* Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. *Microbes Infect.* 4(14), 1427–1438 (2002).
- Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77(10), 4284–4294 (2009).
- Demonstration of the process of formation of cryptococcal biofilms and strategies for the prevention or eradication of cryptococcal colonization of medical prosthetic devices.**
- Martinez LR, Casadevall A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Spectr.* 3(3), MB-0006-2014 (2015).
- Brilhante RS, Caetano EP, Oliveira JS *et al.* Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. *Braz. J. Infect. Dis.* 19(5), 459–465 (2015).
- Sloan DJ, Dedicoat MJ, Lalloo DG. Treatment of cryptococcal meningitis in resource limited settings. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22(5), 455–463 (2009).
- Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin. Epidemiol.* 6, 169–182 (2014).
- Gullo FP, Rossi SA, Sardi JeC, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32(11), 1377–1391 (2013).
- Boumendjel A, Ronot X, Boutonnat J. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anticancer drugs? *Curr. Drug Targets* 10(4), 363–371 (2009).
- Vogel S, Barbic M, Jürgenliemk G, Heilmann J. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *Eur. J. Med. Chem.* 45(6), 2206–2213 (2010).
- de Mattos CB, Argenta DF, Melchiades GeL *et al.* Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5529–5542 (2015).
- Singh H, Sidhu S, Chopra K, Khan MU. Hepatoprotective effect of trans-chalcone on experimentally induced hepatic injury in rats: inhibition of hepatic inflammation and fibrosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94(8), 879–887 (2016).
- Wang YH, Dong HH, Zhao F *et al.* The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26(13), 3098–3102 (2016).
- Mechanism of action of chalcone on fungi.**

- 17 López SN, Castelli MV, Zacchino SA *et al.* *In vitro* antifungal evaluation and structure–activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg. Med. Chem.* 9(8), 1999–2013 (2001).
- 18 Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93(3), 256–267 (2011).
- Review about the *Galleria mellonella* model as a useful host system for human pathogens.
- 19 Champion OL, Wagley S, Titball RW. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence* 7(7), 840–845 (2016).
- 20 Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med. Mycol.* 42(4), 355–362 (2004).
- 21 CLSI. *Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard* (3rd Edition). CLSI document M27-A3 (ISBN-1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, PA, USA (2008).
- 22 Passalacqua TG, Dutra LA, de Almeida L *et al.* Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(16), 3342–3345 (2015).
- 23 Passalacqua TG, Torres FA, Nogueira CT *et al.* The 2',4'-dihydroxychalcone could be explored to develop new inhibitors against the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania* species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(17), 3564–3568 (2015).
- 24 Zeraik ML, Ximenes VF, Regasini LO *et al.* 4'-Aminochalcones as novel inhibitors of the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Curr. Med. Chem.* 19(31), 5405–5413 (2012).
- 25 Soares L, Gullo F, Sardi J *et al.* Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 957860 (2014).
- 26 Martínez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3), 1021–1033 (2006).
- 27 Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling* 30(6), 719–727 (2014).
- 28 Martínez LR, Mihi MR, Han G *et al.* The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31(4), 669–679 (2010).
- 29 Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, de Witte PA, Esguerra CV, Crawford AD. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. *PLoS ONE* 7(10), e43850 (2012).
- Discussion and comparison of the zebrafish embryo toxicity.
- 30 Busquet F, Strecker R, Rawlings JM *et al.* OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69(3), 496–511 (2014).
- 31 de Lacorte Singulani J, Scorzoni L, de Paula E, Silva AC, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48(3), 292–297 (2016).
- 32 Luna B, Drew RH, Perfect JR. Agents for treatment of invasive fungal infections. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 33(2), 277–299 (2000).
- 33 Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med. J. Aust.* 187(7), 404–409 (2007).
- 34 Lipp HP. Antifungal agents – clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Mycoses* 51(Suppl. 1), 7–18 (2008).
- 35 de Carvalho Tavares L, Johann S, Maria de Almeida Alves T *et al.* Quinolinyl and quinolinyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* 46(9), 4448–4456 (2011).
- 36 Kulkarni RR, Tupe SG, Gamble SP *et al.* Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. *Nat. Prod. Res.* 28(4), 245–250 (2014).
- 37 Kuhn DM, Ghannoum MA. Candida biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5(2), 186–197 (2004).
- 38 Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(22), 7977–7984 (2012).
- 39 de Aguiar Cordeiro R, Mourão CI, Rocha MF *et al.* Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32(4), 557–564 (2013).
- 40 Ducharme NA, Reif DM, Gustafsson JA, Bondesson M. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: implications for chemical testing. *Reprod. Toxicol.* 55, 3–10 (2015).
- 41 Rizzo LY, Golombek SK, Mertens ME *et al.* *In vivo* nanotoxicity testing using the zebrafish embryo Assay. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 1, doi:10.1039/C3TB20528B (2013) (Epub ahead of print).
- 42 Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* 9(8), e105076 (2014).
- 43 Favre-Godal Q, Dorsaz S, Queiroz EF *et al.* Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of *in vivo* activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry* 105, 68–78 (2014).
- 44 Mircus G, Albert N, Ben-Yaakov D *et al.* Identification and characterization of a novel family of selective antifungal compounds (CANBEFs) that interfere with fungal protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(9), 5631–5640 (2015).



Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model

Tatiane Benaducci¹, Janaina de C. O. Sardi¹, Natalia M. S. Lourencetti¹, Liliansa Scorzoni¹, Fernanda P. Gullo¹, Suélen A. Rossi¹, Jaqueline B. Derissi¹, Márcia C. de Azevedo Prata², Ana M. Fusco-Almeida¹ and Maria J. S. Mendes-Giannini^{1*}

¹ Laboratório de Micologia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil, ² Embrapa Brasileira de Agropecuária, Juiz de Fora, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Leland Shapiro,
Denver Veterans Affairs Medical
Center and University of Colorado
Denver, USA

Reviewed by:

Frederic Lamoth,
Lausanne University Hospital,
Switzerland
Mary Ann Degroote,
Colorado State University, USA

*Correspondence:

Maria J. S. Mendes-Giannini
giannini@fcfar.unesp.br;
gianninj@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 04 August 2015

Accepted: 23 February 2016

Published: 09 March 2016

Citation:

Benaducci T, Sardi JdCO,
Lourencetti NMS, Scorzoni L,
Gullo FP, Rossi SA, Derissi JB,
de Azevedo Prata MC,
Fusco-Almeida AM
and Mendes-Giannini MJS (2016)
Virulence of *Cryptococcus* sp.
Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using
Galleria mellonella as an Alternative
Model. *Front. Microbiol.* 7:290.
doi: 10.3389/fmicb.2016.00290

Cryptococcus neoformans and *C. gattii* are fungal pathogens that are most commonly found in infections of the central nervous system, which cause life-threatening meningoencephalitis and can grow as a biofilm. Biofilms are structures conferring protection and resistance of microorganism to the antifungal drugs. This study compared the virulence of planktonic and biofilm cells of *C. neoformans* and *C. gattii* in *Galleria mellonella* model, as well as, the quantification of gene transcripts *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* by real time PCR. All three of the genes showed significantly increased expressions in the biofilm conditions for two species of *Cryptococcus*, when compared to planktonic cells. *C. neoformans* and *C. gattii* cells in the biofilm forms were more virulent than the planktonic cells in *G. mellonella*. This suggests that the biofilm conditions may contribute to the virulence profile. Our results contribute to a better understanding of the agents of cryptococcosis in the host-yeast aspects of the interaction.

Keywords: *Cryptococcus* sp., biofilms, virulence, *Galleria mellonella*

INTRODUCTION

Invasive fungal infections (IFIs) are of global importance. An increasing number of cases have been observed in recent years, and despite current antifungal therapy, mortality rates are high (Perfect, 2013). Among the pathogens causing IFIs, the yeast *Cryptococcus neoformans* is the most prominent in infections of immunocompromised individuals, but *C. gattii* can also cause infections in immunocompetent persons (Tortorano et al., 2012; Perfect, 2013; Prates et al., 2013). The number of cases of cryptococcosis has increased exponentially in the last 30 years due to the advent of AIDS, the use of immunosuppressive therapy in transplant patients and the use of chemotherapeutic agents (McClelland et al., 2013). The use of antiretroviral therapy has been shown to be important in the diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV patients, because increasing of CD4 creates benefits for early diagnosis of cryptococcosis through serology (Rajasingham and Boulware, 2015). Although the most serious disease manifestation is meningoencephalitis, cryptococcal pneumonia is underdiagnosed and may disseminate to the central nervous system (CNS) and other sites, depending upon host defenses (Brizendine et al., 2011).

Cryptococcus neoformans remains the most prevalent human pathogen in this genus and is found in the environment worldwide. Formerly, *C. gattii* was reported mainly in Australia and other subtropical and tropical areas, where it was linked to eucalyptus trees (Smith and Kauffman, 2012). Approximately 1 million cases of cryptococcosis are reported annually, resulting in 600,000 deaths per year (Stie and Fox, 2012; Zhu et al., 2012) and approximately one third of cases (Pyrgos et al., 2013) were related to non-HIV (Bratton et al., 2012; Brizendine et al., 2013). In Brazil, cryptococcosis has recently been identified as the most fatal mycosis in AIDS patients (Albuquerque and Rodrigues, 2012).

The mechanisms of pathogenicity and virulence factors correspond, respectively, to the strategies of the organism or its products to contribute to its virulence. The virulence factors of infectious agents are complex and multifactorial. Polysaccharide synthesis; the capsule; melanin; ability to growth at 37°C; extracellular enzymes such as laccase, phospholipase B, and urease; and biofilm formation are considered to be virulence factors for *Cryptococcus* sp. (Casadevall and Pirofski, 2001; Robertson and Casadevall, 2009; Zaragoza et al., 2009; Kronstad et al., 2011).

Biofilms are communities of microorganisms involving an extracellular matrix attached to a solid surface, whose development provides important benefits such as increased nutrient concentrations in the biofilm-liquid interface. The polymer matrix promotes the adsorption of nutrient molecules and provides protection from environmental insults (pH changes, salt concentration, dehydration, aggressive chemicals, bactericides, antibiotics, predators, lytic bacteria, and heavy metals). Thus, biofilm microorganisms differ profoundly from planktonic cells but retain their invasiveness and ability to evade the host immune system (Costerton et al., 1995; Sardi et al., 2013). *C. neoformans* is able to form biofilm on medical devices, including ventriculoatrial shunt catheters (Walsh et al., 1986; Bach et al., 1997), peritoneal dialysis fistula (Braun et al., 1994) and prosthetic cardiac valves (Banerjee et al., 1997), that highlight the ability of this organism to adhere to medical devices. Normally, patients who do not benefit from antifungal therapy and patients who present serious visual loss or ocular palsies or remain with high cerebrospinal fluid pressure levels, must be considered for ventriculoperitoneal placement (Corti et al., 2014). The increasing use of shunts to manage intracranial hypertension associated with cryptococcal meningoencephalitis suggests the importance of investigating the biofilm-forming properties of this organism (Bach et al., 1997) apud (Martinez and Casadevall, 2015).

Non-conventional animal models of infection can be used to investigate the virulent traits of a pathogen or the therapeutic efficacy of a drug, as well as the host-pathogen interactions. The *Galleria mellonella* model represents a versatile experimental system to study fungal virulence and antifungal efficacy (Mylonakis et al., 2005; Fuchs and Mylonakis, 2006; Scorzoni et al., 2013).

The objective of this study was to evaluate the ability of *C. neoformans* and *C. gattii* in biofilm and planktonic forms in *G. mellonella*, an alternative model, and to relatively quantify the gene transcripts involved in virulence by real time PCR.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Cryptococcus neoformans var. *grubii* ATCC 90112, serotype A, molecular type VNI and *C. gattii* ATCC 56990, serotype BC, molecular type VGIII, belonging to the mycology collection of the Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara were used in this study. Yeasts were kept frozen in glycerol and subcultured at the time of the experiment.

Biofilm Formation

Both *C. neoformans* and *C. gattii* were grown in Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with shaking (200 rpm) at 37°C until the late log phase (as determined by a growth curve constructed from absorbance readings at an optical density of 600 nm). Biofilm formation was performed according to Martinez and Casadevall (2005), with some modifications. The cells were collected by centrifugation, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted with a hemocytometer, and suspended at 1×10^8 cells/mL in PBS. For each microorganism, 100 μ L of the suspension was added into individual polystyrene wells in 96-well plates (TPP Trasadingen, Switzerland), and the plates were incubated at 37°C without shaking for 2 h for the adhesion stage. The mature biofilms were formed for 72 h with shaking at 70 rpm at 37°C in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) that contained L-glutamine, but not sodium bicarbonate, was supplemented with 2% glucose, and was buffered to pH 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The wells without *Cryptococcus* cells were used as controls. Following the adhesion stage, the wells containing *Cryptococcus* biofilms were washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS to remove non-adhered cryptococci. Fungal cells that remained attached to the plastic surface were considered true biofilms. All assays were carried out in triplicate.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Cryptococcus sp. biofilms were grown on glass coverslips in microtiter plates with RPMI-1621 for 72 h. Coverslips with biofilms were then washed three times with PBS and transferred to another microtiter plate containing 2.5% glutaraldehyde and incubated for 48 h at 4°C. The samples were serially dehydrated in alcohol, fixed in a critical-point drier (Samdri-790; Tousimis, Rockville, MD, USA), coated with gold-palladium (Desk-1; Denton Vacuum, Inc., Cherry Hill, NJ, USA), and viewed with a JEOL (Tokyo, Japan) JSM-6400 scanning electron microscope at a voltage of 10.0 kV; the image was captured at 10,000 \times .

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal microscopy was performed according to Martinez and Casadevall, 2005. Mature biofilms were incubated for 45 min at 37°C in a solution of CAAF 488 (Concanavalin A conjugated to Alexa Fluor 488, CAAF; Molecular Probes, USA) and FUN 1 (Molecular Probes, USA). Thus, 4 µL of FUN 1 (10 mM) and 15 µL of CAAF 488 (5 mg/mL) were added to 3 mL of sterile PBS to obtain 10 µg/mL FUN 1 and 25 µg/mL CAAF. Subsequently, the coverslips were washed with distilled water taken from the wells and inverted over 4 µL of Fluoromount-G (Sigma-Aldrich, USA) that was previously deposited on microscope slides for observation under confocal microscopy (LSM 510 META, Zeiss). These trials were conducted in collaboration with the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro, Department of Cell Biology, under the coordination of Professor Dr. Marcelo Machado Pelajo.

Metabolic Activity of the Biofilm

The metabolic activity of the biofilms was evaluated according to (Martinez and Casadevall, 2006b). Semi-quantitative measurements of planktonic cells, biofilm formations and mature biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii* were obtained from the reduction assay of 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). The metabolic activity of the cells was measured by mitochondrial dehydrogenase activity, which reduces the XTT tetrazolium salt to formazan salt, resulting in a colorimetric change. For this assay, 50 µL of XTT solution (1 mg/mL in PBS) and 4 µL of a solution of menadione (1 mM in acetone, Sigma Chemical Co.) were added to each well. The microplates were incubated at 37°C for 5 h and measured at 490 nm (Microplate Reader iMark TM, BIO-RAD). In all experiments, RPMI was included as a negative control.

Antifungal Activity of Amphotericin B

The antifungal activity of amphotericin B (AMB) against planktonic cells and biofilm of *C. neoformans* and *C. gattii* was evaluated by metabolic activity quantification. AMB was tested in range of concentration equal to 0.0625–128 µg/mL for 48 h of treatment and the fungicidal concentration (FC) was considered the lower concentration to metabolic activity below 10% (Martinez and Casadevall, 2006b). This assay was performed XTT assay as previously described.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted from *Cryptococcus* sp. in planktonic and biofilm formations using TRIZOL® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, USA) according to the manufacturer's instructions. The total RNA from the two situations was treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); its concentration and purity were then determined using a spectrophotometer (GE, Nanovue Plus). The integrity of the RNA was verified by electrophoresis with 1% agarose gels. RNA was converted to cDNA using 1 µg of total RNA and reverse transcriptase (RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase, Fermentas Life Sciences, Canada).

Real Time PCR of the Genes *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* in Planktonic and Biofilm Formations

For the analysis of differential gene expressions by RT-PCR (Real Time PCR), specific primers were used for genes (**Supplementary Table S1**) encoding proteins that are differentially expressed in *C. neoformans* (ATCC 90112) and *C. gattii* (ATCC 56990) strains in planktonic and biofilm formations. Primers were used at 0.8 µM each for specific forward and reverse primer and cDNA at 20 ng in 20 µL reactions. The test was performed by Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), and the *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene was used as a reference gene. The reaction program was 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s, and annealing and synthesis occurred at 60°C for 1 min. Following PCR, a melting-curve analysis was performed, which confirmed that the signal corresponded to a single PCR product in an Applied Biosystems 7500 cycler. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ target} - \Delta Ct \text{ endogen}$; Livak and Schmittgen, 2001).

Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

Galleria mellonella caterpillars were produced by EMBRAPA – Juiz de Fora/MG. Larvae weighing 100–200 mg were selected for the experiment. The day before the experiment, the larvae were stored at 37°C. The biofilms were destroyed with a scraper, and the cells were counted in a hemocytometer chamber together with the planktonic cells for the final concentration of 5×10^6 cells/larvae (cell concentrations previously standardized with planktonic cells). Larvae were infected with 10 µL of inocula injected into the hemocell through the last proleg using a Hamilton syringe (Hamilton, EUA). The groups of *G. mellonella* were incubated at 37°C for 7 days, and their death was monitored daily. The death of the larvae was assessed by the lack of movement after touching them with tweezers. For each condition, a total of 16 larvae were used, and each experiment was repeated at least twice.

Statistical Analysis

All analyses of the dates were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Survival curves were analyzed by the Log-rank (Mantel-Cox) Test. Real time PCR was performed statistically by *t*-test and *p*-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Biofilm Formation

The ability of the *C. neoformans* and *C. gattii* strains to form biofilms *in vitro* was evaluated. Biofilm formation by *Cryptococcus* sp. was demonstrated by SEM. It was observed that every strain was able to form agglomerates of cells characterized by a microorganism community firmly adhered to a non-biological surface and resulting in the

formation of a mature biofilm. The SEM data provided useful information on the cell morphology present in the biofilm structure. The biofilms of *C. neoformans* (Figures 1A,B) and *C. gattii* (Figures 1C,D) strains consist of a dense network of yeasts.

Confocal Laser Microscopy

Confocal laser scanning microscopy is useful for determining the viability/activity of the cells adhered to the glass surface and for analyzing the biofilm thickness. Applying two fluorochromes, Concanavalin A conjugated to Alexa Fluor 488 (CAAF) and FUN1, to determine the activity/viability allows the observation of metabolically active structures in fungal cells. In combination, the CAAF specifically binds to cell wall polysaccharides. Images of mature biofilms of *C. neoformans* ATCC 90112 and *C. gattii* ATCC 56990 were acquired by confocal microscopy (Figures 2A,C). The yellow-orange staining due to FUN1 is dense in the cytoplasm of metabolically active cell aggregates, while the green coloration results from the binding of Concanavalin A to the glucose and mannose moieties of the fungal cell wall. Orthogonal images of biofilms of the strains were analyzed to determine their thickness and architecture. Sections of the three-dimensional images showed that the biofilm of *C. neoformans* strain ATCC 90112 has a thickness of 10 μm (Figure 2B), while *C. gattii* ATCC 56990 (Figure 2D) has a thickness of 5.4 μm .

Kinetics of Biofilm Formation

The kinetics of biofilm formation on polystyrene microdilution plates by both *Cryptococcus* species was compared using the colorimetric XTT reduction assay to determine metabolic activity. During a period of 2 h, the *Cryptococcus* yeast became firmly adhered to the plastic surface. In the intermediate stage (12 h) the fungal population increased to form a cell monolayer, thus initiating the process of biofilm formation. During the maturation stage (24–72 h), fungal growth involves the formation of microcolonies consisting of clustered cells and resulting in compact structures adhering to the plastic surface.

All samples produced biofilms from 24 to 72 h, and the initial biofilm formation was observed by 2 h of incubation, which includes the period of initial adhesion. Over a period of 12 to 24 h, a continuously increasing biofilm was observed. The kinetics of biofilm formation was similar in both strains analyzed and showed no significant differences (Figure 3).

Antifungal Activity of Amphotericin B

The Supplementary Table S2 shows the values of fungicidal concentration (FC) of AMB for *C. neoformans* and *C. gattii* in planktonic and biofilm conditions. The FC was 0.5 and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for planktonic cells of *C. neoformans* and *C. gattii*,

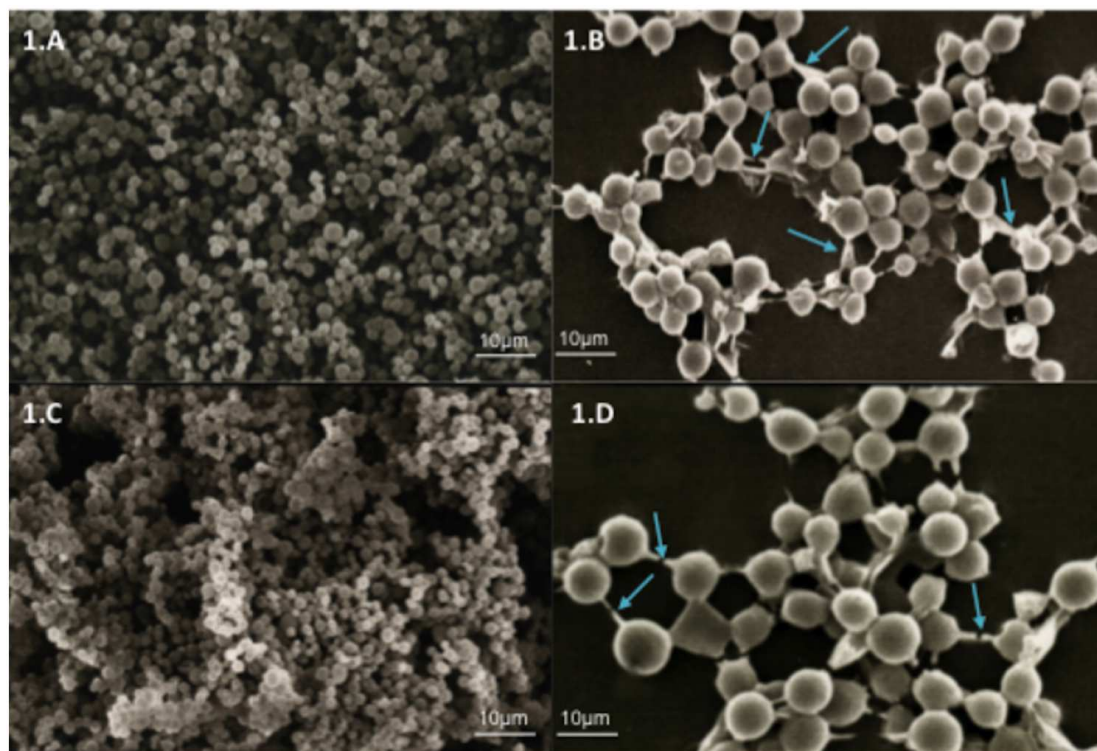


FIGURE 1 | Scanning electron microscopy (SEM) showing yeast communities adhered to surfaces of glass coverslips indicating the formation of mature biofilms. (A) Biofilm of *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 at 750 \times magnification. **(B)** Biofilm of *C. neoformans* ATCC 90112 at 3500 \times magnification. **(C)** Biofilm of *C. gattii* 56990 at 750 \times magnification. **(D)** Biofilm of *C. gattii* 56990 at 2500 \times magnification. The blue arrows indicate the self-produced matrix.

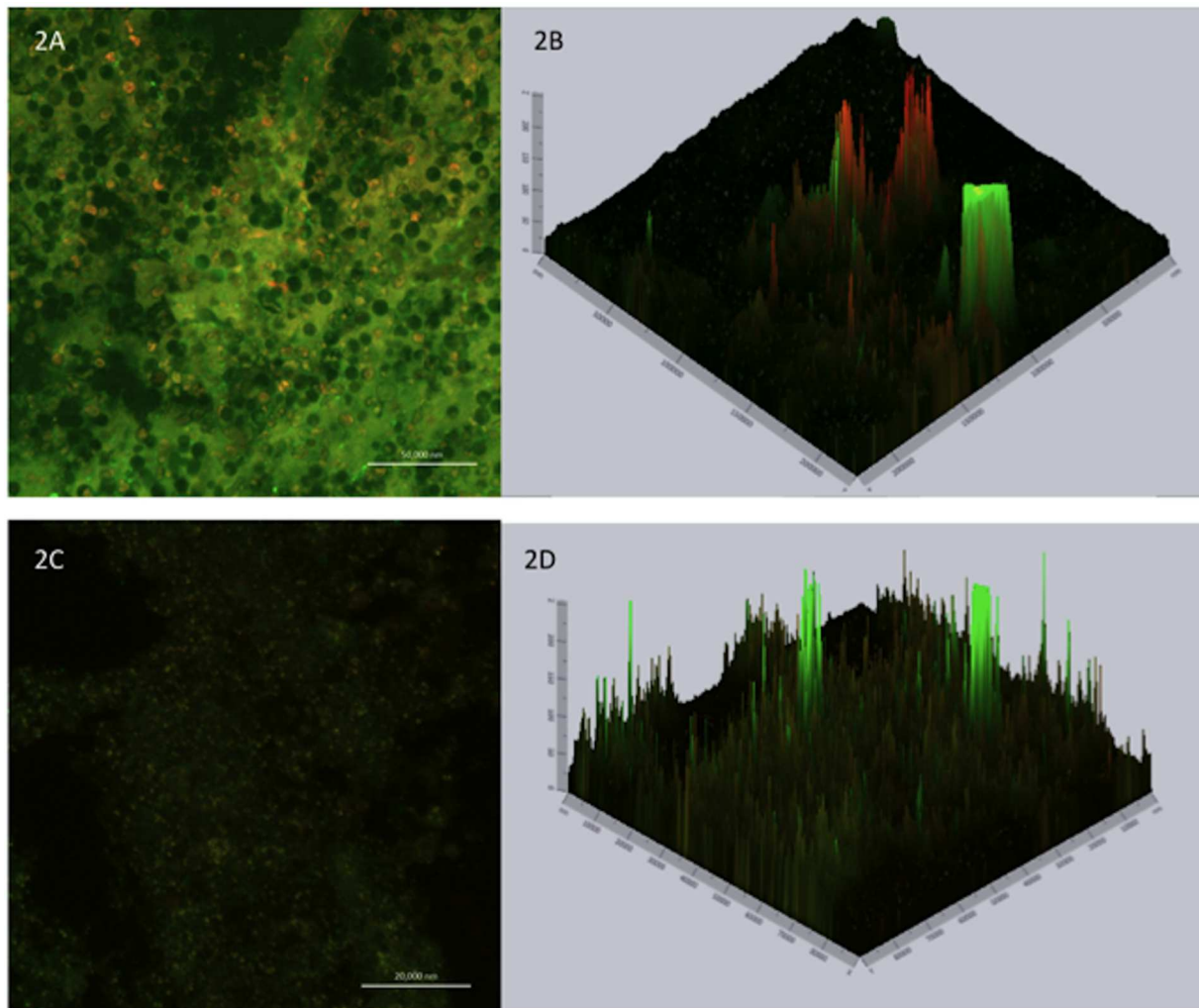


FIGURE 2 | Confocal laser microscopy showing metabolically active cells in mature biofilms. Staining with FUN1 fluorochrome shows the cytoplasm of metabolically active cells dyed orange–yellow. Staining with concavalin associated with Alexa Fluor 488 (CAAF) shows the presence of mannose in the cell wall of *Cryptococcus* sp. Orthogonal images show the thickness and architecture of the biofilms. **(A)** Mature biofilm of *C. neoformans* ATCC 90112. **(B)** Thickness of mature biofilm of *C. neoformans* ATCC 90112. **(C)** Mature biofilm of *C. gattii* ATCC 56990. **(D)** Thickness of mature biofilm of *C. gattii* ATCC 56990.

respectively. In the biofilm condition, we observed an increase of the fungicidal concentration for *C. neoformans* as well as *C. gattii*, both with concentration of 64.0 µg/mL.

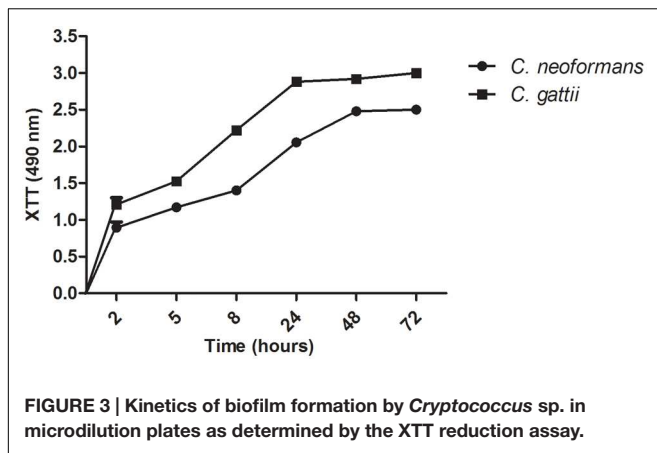
Gene Expressions of *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* in Biofilms and Planktonic Cells of *Cryptococcus* sp.

We used real time PCR assay, with *GAPDH* as the internal control. The results of the relative gene expressions of *URE1*, *LAC1*, and *CAP59* with biofilm and planktonic cells of *C. neoformans* and *C. gattii* are shown in **Figure 4**. All three of the genes showed significantly increased expressions in the biofilm conditions for two species of *Cryptococcus*, when compared to planktonic cells. However, we can see that the increased expression of genes *LAC1* and *URE1* was more relevant when comparing biofilm and planktonic cells of *C. gattii*. On the

other hand, the increase in *CAP59* expression in biofilms of *C. neoformans*, when compared with planktonic cells, showed higher significance than other genes.

Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

To determine an adequate concentration for the virulence tests with planktonic and biofilm cells, survival curves were created for different concentrations of yeast (planktonic). The concentration of 5×10^6 cells/larvae was selected for the experiments (data not shown). The virulence of the biofilm and planktonic cells were then compared *in vivo* in the *G. mellonella* model. After 4 days, all larvae infected with cells from *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms were dead. Larvae infected with planktonic cells exhibited 30% live larvae when infected with *C. neoformans* and 80% live larvae when infected with *C. gattii* in the time of 4 days.



It is clear that cells from biofilms are more virulent, and in the final part of the experiment (7 days), live larvae still remained. When larvae were infected with planktonic cells, the death rate did not reach 100% in any of the strains tested (Figure 5).

DISCUSSION

Characterizations of the virulence factors of infectious agents have revealed great complexity. These factors can be divided into two categories: those that promote colonization and invasion as biofilms and those that damage the host by the production of hydrolytic enzymes (Mendes-Giannini et al., 2000). Biofilm formation is a common mechanism used by microorganisms to survive in hostile environments and to colonize and establish themselves in new environments, thus conferring protection against their destruction (Hall-Stoodley et al., 2004). Moreover, fungal biofilms are an increasing clinical problem associated with high mortality rates (Williams and Costerton, 2012). The production of melanin (Williamson, 1994), the presence of capsules (Kwon-Chung et al., 1992), growth at 37°C (Kraus et al., 2003), alpha mating type (Kwon-Chung et al., 1982), and the production of phospholipase (Wright et al., 2004), superoxide dismutase (Cox et al., 2003), protein kinases (Alspaugh et al., 1998), and urease (Cox et al., 2000), as well as the synthesis of polysaccharides (Albuquerque et al., 2014), were phenotypically and molecularly characterized as *in vivo* virulence factors related to invasion and survival in the host (Perfect, 2005).

In this study, strains of *C. neoformans* and *C. gattii* were able to form biofilms. These data were confirmed, and electron microscopy showed the formation of a dense network of yeasts with a self-produced extracellular matrix linking the cells of *Cryptococcus* sp. Factors such as the characteristics of the medium and the attachment surface are important for biofilm development by *Cryptococcus* sp., and strains of *C. neoformans* formed denser biofilms when they were cultured in RPMI 1640 medium (Martinez and Casadevall, 2006a). Biofilm formation is the most common growth form of microorganisms in nature; it represents up to 65% of all clinical infections, and given the high level of antimicrobial resistance, biofilms represent a huge problem in clinical practice (Donlan and Costerton,

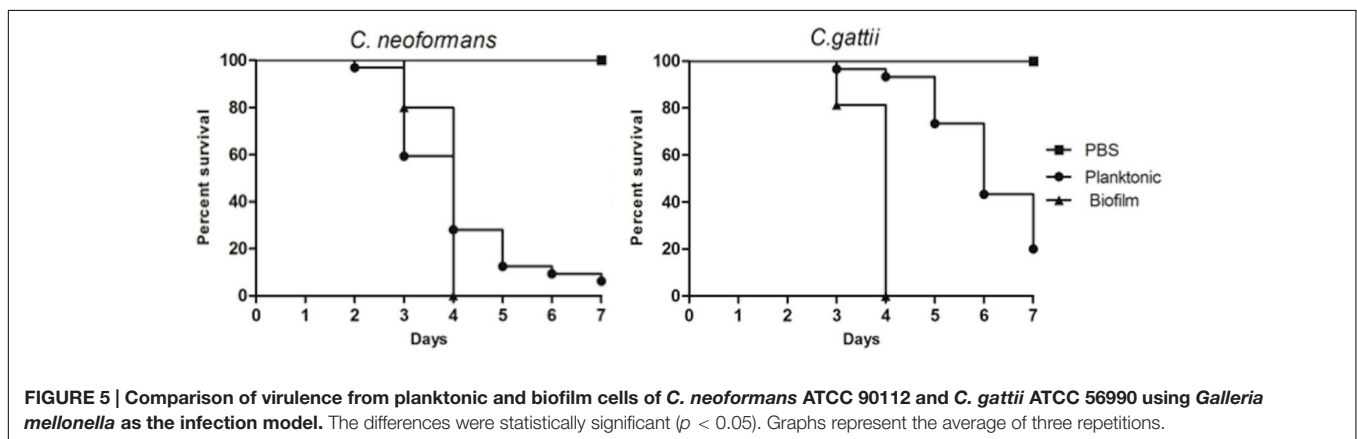
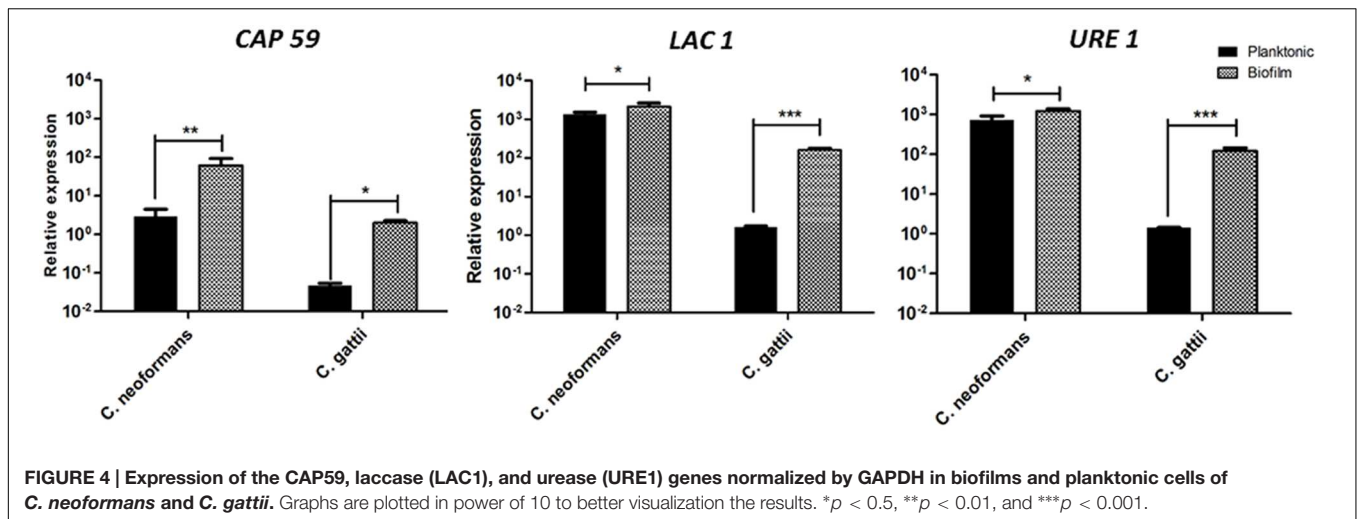
2002; Ramage and Williams, 2013; Martinez and Casadevall, 2015). Biofilm production by *Cryptococcus* species has often been described as a strategy associated with chronic infection resulting from acquired resistance to host immune mechanisms and antifungal therapy (Martinez et al., 2006).

Amphotericin B activities increased 100X the fungicidal concentration for both species in biofilm condition. Our data corroborate to Martinez and Casadevall (2006a), since the authors showed a lower reduction in metabolic activity of *C. neoformans* biofilms when treated with the AMB in concentrations of 4 and 8 µg/mL, while for planktonic cells, the metabolic activity is reduced significantly after treatment with 0.5 µg/mL of AMB.

Additionally, our results demonstrated increased expression of the *CAP59* gene in *C. neoformans* and *C. gattii* when compared the biofilm situations to the planktonic mode, suggesting that this gene may be related to the virulence of this infection. Although no studies of the *CAP59* gene have been described in biofilms, the importance of this increased expression could be related to virulence and resistance because the presence of the capsule prevents the actions of both phagocytes and antifungal drugs. Few studies have been made of *C. gattii*; the genes that regulate virulence were therefore inferred from the work on *C. neoformans*. Several virulence factors were identified using *C. neoformans* as a model (Perfect, 2005). Some evidence of differences in the regulation of virulence genes between the two species have been published (Hicks and Heitman, 2007; Ngamskulrungraj et al., 2009). Our results demonstrated increased expression of *CAP* genes in the biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii*. It has been reported that *C. neoformans* requires four genes to form the capsule: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60*, and *CAP10* (Chang et al., 1996; Grijpstra et al., 2009). However, unencapsulated homologs of *CAP10*, *CAP59*, and *CAP64* have been found in other fungi, suggesting that these genes may be involved in other processes (García-Rivera et al., 2004). *CAP59* was the first gene that was directly related to the phenotype of the capsule and to virulence (Chang and Kwon-Chung, 1994), and it is present in all varieties of *C. neoformans* (Alspaugh et al., 1998). Del Poeta (2004) suggested that changes in the capsule structure could be related to responses to specific environmental conditions, with important implications for the host immune response (Del Poeta, 2004).

Our results also demonstrated an increased expression of laccase, due to expression of *LAC1* gene, in the biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii* compared to planktonic cells. Laccase, a phenoloxidase, was described by Zhu et al. (2001) in as an important virulence factor contributing to the protection of the fungus against oxidative damage by host phagocytes; it is located in the cell wall of *C. neoformans* (Zhu et al., 2001). The enzyme has also been described for *C. gattii* (Sorrell, 2001) and may also modulate the immune response and contribute to the spread of the disease to the CNS (Qiu et al., 2012).

Urease, codified by the gene *URE1*, is a metalloenzyme that catalyzes the hydrolysis of urea to ammonia and carbamate in physiological conditions and increases the pH. The importance of this enzyme was described in *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, and its clinical significance was described in



C. neoformans, *C. gattii*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon*, and *Aspergillus* species (Cox et al., 2000). The urease gene was expressed more in the biofilm condition in *C. neoformans* and *C. gattii* than in planktonic cells. Urease may promote the transmigration of the fungus across the blood–brain barrier and facilitate invasion of the CNS, indicating that urease activity can affect the interaction of the fungus with the endothelial cells and brain microcapillaries in the blood–brain barrier (Morrow and Fraser, 2013). Cox et al. (2000) suggested that urease activity in murine models increases the survival of mice infected with the mutant urease-negative gene (Cox et al., 2000), and Feder et al. (2015) demonstrated the importance of this enzyme in the virulence of *C. gattii*. In this work we emphasize, for the first time, the importance of these three genes in the biofilm condition (Feder et al., 2015).

Additionally, the importance of using alternative animal models in the study of virulence is increasing due to advantages such as the absence of ethical issues, cost, and the possibility of using a large number of individuals (Fuchs and Mylonakis, 2006; Desalermos et al., 2012). The use of *G. mellonella* in the study of *Cryptococcus* virulence is well documented (Firacative et al., 2014; Desalermos et al., 2015; Trevijano-Contador et al., 2015). Mylonakis et al. (2002) evaluated the virulence, host

immune responses and efficacy of antifungal compounds and considered the *G. mellonella* model suitable for *in vivo* studies of *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2002). Fuchs et al. (2010) also described *G. mellonella* as an appropriate model for the study of this yeast (Fuchs et al., 2010) and Desalermos et al. (2015) studied *C. neoformans* and various genes involved in the yeast–host interaction in *C. elegans* and *G. mellonella* (Desalermos et al., 2015). Although insects and mammals are evolutionary distance, *G. mellonella* presents characteristics that support its use as *in vivo* model for fungal assays. The presence of at least six cellular type in hemolymph including phagocytic cells and the possibility of maintain *G. mellonella* at 37°C to simulate the mammalian temperature are important when considering the use of this alternative animal model in the study of human fungal disease (Kavanagh and Reeves, 2004; Fuchs and Mylonakis, 2006; Desalermos et al., 2012). Moreover, correlations have been found in mammals with respect to virulence and antifungal treatment (Mylonakis et al., 2005; London et al., 2006). Biofilm-producer and non-producer strains of *Candida albicans* were evaluated in *G. mellonella* and showed the biofilm-producer's high ability to kill larvae (Cirasola et al., 2013).

As part of the characterization of the biofilms of *Cryptococcus* sp., we evaluated the virulence these species in planktonic

and biofilm conditions in a *G. mellonella* model. The survival curve revealed that cells from biofilms are more virulent than planktonic cells, and this profile was also observed for *C. neoformans* and *C. gattii*. Microorganisms are protected by the extracellular matrix in biofilms, which is mainly composed of glycoproteins and polysaccharides. In addition to conferring protection and resistance, our results showed that biofilm cells are more virulent and quickly cause death in *G. mellonella* larvae.

Wand et al. (2012) reported that *Acinetobacter baumannii* biofilms could produce higher rates of mortality in the *G. mellonella* model compared to planktonic cells of various clinical isolates. Cirasola et al. (2013) also observed the virulence of clinical isolates of *C. albicans* with or without biofilm capability; the survival of *G. mellonella* larvae following infection was reduced and 80% of the infected larvae died within 72 h.

Our studies revealed that *Cryptococcus* sp. yeast cells that underwent biofilm formation for the first-time were more virulent than cells that have not gone through the same process when analyzed in the *G. mellonella* model. Other virulence factors could be involved during biofilm formation that might help us to understand pathogenic infections in *G. mellonella*. A study conducted by Uppuluri and Lopez-Ribot (2010) showed that cells that detach from a biofilm have a greater association with mortality than those from planktonic microorganisms. The dispersed cells of biofilms are more virulent and cause higher mortality than planktonic cells, which can be explained by epigenetic alterations within the cells that undergo biofilm development (Uppuluri and Lopez-Ribot, 2010; Sardi et al., 2014). Ramage et al. (2012) demonstrated an increased expression of aspartyl proteinases in *C. albicans* biofilms compared with planktonic cells. Their study reported that the production of proteinase by *C. albicans* established adhesion, invasion, and tissue destruction. Their results demonstrate that the expression of proteinases may be related to the severity of disease because the expression of these enzymes was significantly higher in mature biofilms (Ramage et al., 2012). *C. neoformans* also produces various proteases and aspartyl proteinases which have been proposed as potential virulence factors that contribute to host tissue invasion and colonization by the pathogen. The

increase in proteases could explain the premature death of the larvae infected with *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms.

These preliminary results demonstrate the higher virulence of *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms. Additional studies are needed to understand the virulence mechanisms of the biofilms involved in the premature death of the larvae.

These preliminary results demonstrate the higher resistance of AMB and virulence in *G. mellonella*, as well as increased expression of virulence genes of *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms. Additional studies are needed to understand the virulence mechanisms of the biofilms involved in the premature death of the larvae.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Rede Nacional de Métodos Alternativos – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (RENAMA-CNPq) 403586/2012-7; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC/FCF).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00290>

TABLE S1 | Primers used for RT-pPCR analysis for the virulence analysis.

TABLE S2 | Fungicidal concentration of amphotericin B for planktonic cells and biofilm mature of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.

REFERENCES

- Albuquerque, P. C., Fonseca, F. L., Dutra, F. F., Bozza, M. T., Frases, S., Casadevall, A., et al. (2014). *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan fractions of different molecular masses are functionally distinct. *Future Microbiol.* 9, 147–161. doi: 10.2217/fmb.13.163
- Albuquerque, P. C., and Rodrigues, M. L. (2012). Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol.* 7, 319–329. doi: 10.2217/fmb.11.162
- Alsbaugh, J. A., Perfect, J. R., and Heitman, J. (1998). Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 25, 1–14. doi: 10.1006/fgbi.1998.1079
- Bach, M. C., Tally, P. W., and Godofsky, E. W. (1997). Use of cerebrospinal fluid shunts in patients having acquired immunodeficiency syndrome with cryptococcal meningitis and uncontrollable intracranial hypertension. *Neurosurgery* 41, 1280–1282. doi: 10.1097/00006123-199712000-00008
- Banerjee, U., Gupta, K., and Venugopal, P. (1997). A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 139–141. doi: 10.1080/02681219780001031
- Bratton, E. W., El Hussein, N., Chastain, C. A., Lee, M. S., Poole, C., Stürmer, T., et al. (2012). Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS ONE* 8:e43582. doi: 10.1371/journal.pone.0043582
- Braun, D. K., Janssen, D. A., Marcus, J. R., and Kauffman, C. A. (1994). Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. *Am. J. Kidney Dis.* 24, 864–867. doi: 10.1016/S0272-6386(12)80683-4
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., and Pappas, P. G. (2011). Pulmonary cryptococcosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 727–734. doi: 10.1055/s-0031-1295720
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., and Pappas, P. G. (2013). Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. *PLoS ONE* 8:e60431. doi: 10.1371/journal.pone.0060431
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–344. doi: 10.1086/322044
- Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4912–4919. doi: 10.1128/MCB.14.7.4912

- Chang, Y. C., Penoyer, L. A., and Kwon-Chung, K. J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect. Immun.* 64, 1977–1983.
- Cirasola, D., Sciota, R., Vizzini, L., Ricucci, V., Morace, G., and Borghi, E. (2013). Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol.* 8, 799–805. doi: 10.2217/fmb.13.36
- Corti, M., Priarone, M., Negroni, R., Gilardi, L., Castrelo, J., Arechayala, A. I., et al. (2014). Ventriculoperitoneal shunts for treating increased intracranial pressure in cryptococcal meningitis with or without ventriculomegaly. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 524–527. doi: 10.1590/0037-8682-0176-2013
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., et al. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 68, 443–448. doi: 10.1128/IAI.68.2.443-448.2000
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., et al. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* 71, 173–180. doi: 10.1128/IAI.71.1.173-180.2003
- Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1067–1075. doi: 10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004
- Desalermos, A., Fuchs, B. B., and Mylonakis, E. (2012). Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* 8:e1002451. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451
- Desalermos, A., Tan, X., Rajamuthiah, R., Arvanitis, M., Wang, Y., Li, D., et al. (2015). A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 211, 298–305. doi: 10.1093/infdis/jiu441
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Feder, V., Kmetzsch, L., Staats, C. C., Vidal-Figueiredo, N., Ligabue-Braun, R., Carlini, C. R., et al. (2015). *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS J.* 282, 1406–1418. doi: 10.1111/febs.13229
- Firacative, C., Duan, S., and Meyer, W. (2014). *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* 9:e105076. doi: 10.1371/journal.pone.0105076
- Fuchs, B. B., and Mylonakis, E. (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 346–351. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.004
- Fuchs, B. B. O., Brien, E., Khoury, J. B., and Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1, 475–482. doi: 10.4161/viru.1.6.12985
- García-Rivera, J., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J., and Casadevall, A. (2004). *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell* 3, 385–392. doi: 10.1128/EC.3.2.385-392.2004
- Grijpstra, J., Gerwig, G. J., Wösten, H., Kamerling, J. P., and de Cock, H. (2009). Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8, 1165–1173. doi: 10.1128/EC.00013-09
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. doi: 10.1038/nrmicro821
- Hicks, J. K., and Heitman, J. (2007). Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. *Eukaryot. Cell* 6, 413–420. doi: 10.1128/EC.00213-06
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Kraus, P. R., Fox, D. S., Cox, G. M., and Heitman, J. (2003). The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.* 48, 1377–1387. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03508.x
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. A., Griffiths, E. J., et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 193–203. doi: 10.1038/nrmicro2522
- Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C., and Wickes, B. L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60, 602–605.
- Kwon-Chung, K. J., Polachek, I., and Bennett, J. E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15, 535–537.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- London, R., Orozco, B. S., and Mylonakis, E. (2006). The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res.* 6, 567–573. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00056.x
- Martinez, L. R., Bryan, R. A., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2006). Antibody-guided alpha radiation effectively damages fungal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2132–2136. doi: 10.1128/AAC.00120-06
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2005). Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect. Immun.* 73, 6350–6362. doi: 10.1128/IAI.73.10.6350-6362.2005
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2006a). *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect. Immun.* 74, 6118–6123. doi: 10.1128/IAI.00995-06
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2006b). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1021–1033. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2015). Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–11.
- McClelland, E. E., Hobbs, L. M., Rivera, J., Casadevall, A., Potts, W. K., Smith, J. M., et al. (2013). The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. *PLoS ONE* 8:e63632. doi: 10.1371/journal.pone.0063632
- Mendes-Giannini, M. J., Taylor, M. L., Bouchara, J. B., Burger, E., Calich, V. L., Escalante, E. D., et al. (2000). Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol.* 38, 113–123. doi: 10.1080/mmy.38.1.113.123
- Morrow, C. A., and Fraser, J. A. (2013). Is the nickel-dependent urease complex of *Cryptococcus* the pathogen's Achilles' heel? *MBio* 4:e00408–e00413. doi: 10.1128/mBio.00408-13
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J., and Calderwood, S. B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15675–15680. doi: 10.1073/pnas.232568599
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S. B., et al. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* 73, 3842–3850. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005
- Ngamskulrungraj, P., Himmelreich, U., Breger, J. A., Wilson, C., Chayakulkeeree, M., Krockenberger, M. B., et al. (2009). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect. Immun.* 77, 4584–4596. doi: 10.1128/IAI.00565-09
- Perfect, J. R. (2005). *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 395–404. doi: 10.1016/j.femsim.2005.06.005
- Perfect, J. R. (2013). Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr. Med. Res. Opin.* 29, 3–11. doi: 10.1185/03007995.2012.761134
- Prates, R. A., Fuchs, B. B., Mizuno, K., Naqvi, Q., Kato, I. T., Ribeiro, M. S., et al. (2013). Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* 8:e54387. doi: 10.1371/journal.pone.0054387
- Pyrgos, V., Seitz, A. E., Steiner, C. A., Prevots, D. R., and Williamson, P. R. (2013). Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS ONE* 8:e56269. doi: 10.1371/journal.pone.0056269
- Qiu, Y., Davis, M. J., Dayrit, J. K., Hadd, Z., Meister, D. L., Osterholzer, J. J., et al. (2012). Immune modulation mediated by cryptococcal calyculase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PLoS ONE* 7:e47853. doi: 10.1371/journal.pone.0047853

- Rajasingham, R., and Boulware, D. R. (2015). HIV care: ART adherence support and cryptococcal screening. *Lancet* 385, 2128–2129. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60455-X
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., and Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *Int. J. Microbiol.* 2012, 528521. doi: 10.1155/2012/528521
- Ramage, G., and Williams, C. (2013). The clinical importance of fungal biofilms. *Adv. Appl. Microbiol.* 84, 27–83. doi: 10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3
- Robertson, E. J., and Casadevall, A. (2009). Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2528–2533. doi: 10.1128/AEM.02846-08
- Sardi, J. C., Pitanguí, N. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., and Mendes-Giannini, M. J. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* 31, 22–29. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.014
- Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., and Mendes-Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 62, 10–24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0
- Scorzoni, L., de Lucas, M. P., Mesa-Arango, A. C., Fusco-Almeida, A. M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., et al. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS ONE* 8:e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047
- Smith, J. A., and Kauffman, C. A. (2012). Pulmonary fungal infections. *Respirology* 17, 913–926. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02150.x
- Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety gattii. *Med. Mycol.* 39, 155–168. doi: 10.1080/mmy.39.2.155.168
- Stie, J., and Fox, D. (2012). Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. *PLoS ONE* 7:e49402. doi: 10.1371/journal.pone.0049402
- Tortorano, A. M., Dho, G., Prigitano, A., Breda, G., Grancini, A., Emmi, V., et al. (2012). ECMM-FIMUA Study Group. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). *Mycoses* 55, 73–79. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02044.x
- Trevijano-Contador, N., Herrero-Fernández, I., García-Barbazán, I., Scorzoni, L., Rueda, C., Rossi, S. A., et al. (2015). *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence* 6, 66–74. doi: 10.4161/21505594.2014.986412
- Uppuluri, P., and Lopez-Ribot, J. L. (2010). An easy and economical in vitro method for the formation of *Candida albicans* biofilms under continuous conditions of flow. *Virulence* 1, 483–487. doi: 10.4161/viru.1.6.13186
- Walsh, T. J., Schlegel, R., Moody, M. M., Costerton, J. W., and Salzman, M. (1986). Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. *Neurosurgery* 18, 373–375. doi: 10.1097/00006123-198603000-00025
- Wand, M. E., Bock, L. J., Turton, J. F., Nugent, P. G., and Sutton, J. M. (2012). *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J. Med. Microbiol.* 61, 470–477. doi: 10.1099/jmm.0.037523-0
- Williams, D. L., and Costerton, J. W. (2012). Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 100, 1163–1169. doi: 10.1002/jbm.b.31979
- Williamson, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176, 656–664.
- Wright, L. C., Payne, J., Santangelo, R. T., Simpanya, M. F., Chen, S. C., Widmer, F., et al. (2004). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem. J.* 384, 377–384. doi: 10.1042/BJ20041079
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., de Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 6, 133–216. doi: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0
- Zhu, F., Ma, X. H., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., et al. (2012). Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS ONE* 7:e39782. doi: 10.1371/journal.pone.0039782
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., and Williamson, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect. Immun.* 69, 5589–5596. doi: 10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Benaducci, Sardi, Lourencetti, Scorzoni, Gullo, Rossi, Derissi, de Azevedo Prata, Fusco-Almeida and Mendes-Giannini. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

POSTER PRESENTATION

Open Access

Study of the synergistic activity between industrial yeast strains resistant to high temperature and ethanol concentrations and high fermentative capacity to produce ethanol

Strohmayr Lourencetti Natália Manuela^{1*}, Danieli Flávia², Valentini Roberto Sandro³,
de Lucca Gattás Edwil Aparecida², Soares Mendes Giannini Maria José¹, Zanelli Cleslei Fernando³,
Fusco Almeida Ana Marisa¹

From 5th Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC)
Florianópolis, Brazil. 10-14 November 2013

Fuel-ethanol fermentation process includes a reutilization of the yeast biomass, in which yeast cells are exposed to stress conditions as high temperature and increasing alcohol concentration. This environment may cause a significant delay in fermentation and drop in cell viability. The Bioen program (UNESP) conducted a study to select highly producing yeast strains in a Brazilian distillery. Two of these were selected when comparable to other well established commercial yeast strains: ZFC4 (ethanol best producer) and ZFD4 (most ethanol and temperature tolerant). Based on these data the aim of this work is to study genetic features associated with cell resistance to sustained stress of selected yeast strains in synergy with standards (PE-2, CAT-1 and SA-1) used in Brazilian distillery. The yeast strain was confirmed as *Saccharomyces cerevisiae* using PCR. The strains were screened together for growth of 25 at 44°C on plates containing 10% and 12% (v/v) ethanol and for fermentation assays. All of these demonstrated optimal responses to the high temperature and alcohol concentration and fermentative capacity when comparable to the same yeast strain singly. To gain insight of the cellular mechanisms of resistance to these stresses, global gene expression analysis of the selected strains will be performed.

Authors' details

¹Department of Bioscience and Biotechnology applied to Pharmacy, Mycology Laboratory, UNESP, Araraquara, SP, Brazil. ²Department Food and Nutrition, Fermentation Technology Laboratory, UNESP, Araraquara, SP, Brazil. ³Department of Bioscience and Biotechnology applied to Pharmacy, Molecular Biology Laboratory, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

Published: 1 October 2014

doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P219

Cite this article as: Natália Manuela et al.: Study of the synergistic activity between industrial yeast strains resistant to high temperature and ethanol concentrations and high fermentative capacity to produce ethanol. *BMC Proceedings* 2014 **8**(Suppl 4):P219.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



¹Department of Bioscience and Biotechnology applied to Pharmacy, Mycology Laboratory, UNESP, Araraquara, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article