

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NA MICROBIOTA DO  
MELÃO AMARELO (*Cucumis melo L.*), QUANTO A CAPACIDADE DE  
PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE BIOFILME**

**SÉRGIO BATISTA RAMOS**

RECIFE

2021

SÉRGIO BATISTA RAMOS

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NA MICROBIOTA DO  
MELÃO AMARELO (*Cucumis melo* L.), QUANTO A CAPACIDADE DE  
PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE BIOFILME**

Monografia apresentada  
ao Curso de Licenciatura Plena  
em Ciências biológicas/UFRPE  
como requisito parcial para  
obtenção do grau licenciado em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Profº Drº Delson  
Laranjeira

Co-orientadora: Drª Iwanne Lima  
Coelho.

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação Universidade Federal Rural de  
Pernambuco Sistema Integrado de  
Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a)

---

- R 175c Ramos, Sergio Batista Ramos  
Caracterização de leveduras presentes na microbiota do melão amarelo (*Cucumis melo* L.),  
quanto a capacidade de produção e manutenção de biofilme / Sergio Batista Ramos Ramos. -  
2021.  
68 f. : il.
- Orientador: Delson  
Laranjeira. Coorientadora:  
Iwanne Lima Coelho. Inclui  
referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2022.
1. Cucurbitaceae. 2. Fungos. 3. Cristal violeta. 4. Biotecnologia. I. Laranjeira, Delson, orient.  
II. Coelho, Iwanne Lima, coorient. III. Título

CDD 574

---

SÉRGIO BATISTA RAMOS

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NA MICROBIOTA DO  
MELÃO AMARELO (*Cucumis melo L.*), QUANTO A CAPACIDADE DE  
PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE BIOFILME**

Comissão Avaliadora:

---

Prof.º Dr.º Delson Laranjeira – UFRPE (Departamento de Agronomia – DEPA)

Orientador

---

Prof.ª Dr.ª Fernanda Cristina Bezerra Leite

Titular 1: UFRPE (Departamento de Biologia – DB)

---

Dr.ª Ana Carla da Silva Santos – UFPE

Titular 2: UFPE (Pós-doutoranda, PGBF)

RECIFE

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, a minha família e aos amigos que de perto ou de longe me deram sempre o apoio necessário. Cada dificuldade compartilhada, cada obstáculo superado, cada conquista vivenciada. Agradeço ao universo por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho. Obrigado meus amigos. Agradeço a equipe do Laboratório de Fungos de Solo (LAFSOL) da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelos bons momentos compartilhados, pela troca de conhecimentos e pelo apoio nas horas de dificuldades. Sou muito grato por ter feito parte dessa equipe e deixo aqui meu agradecimento especial para o Mestre e amigo Marcelo Oliveira por todo o apoio nos momentos de grandes dificuldades durante esta longa caminhada. Obrigado Marcelo, pela parceria, pela confiança, pelo apoio, pela amizade e que essa amizade perdure para sempre. Também quero deixar um agradecimento especial para meu amigo, agora mestrando em Fitopatologia, Igor Pimentel, pelas parcerias em nossos trabalhos, os dias de experimentos que perseverávamos juntos para obter bons resultados e obtivemos! Obrigado Igor, você é um grande parceiro, espero levar essa parceria/amizade para o resto da vida. Agradeço ao meu orientador, Professor Delson Laranjeira, por abri as portas do LAFSOL, por acreditar, apoiar e confiar. Obrigado professor Delson por possibilitar que eu pudesse ter uma excelente formação na área que eu tanto gosto, o Senhor é parte fundamental na minha história acadêmica e profissional. Agradeço imensamente ao Senhor. Agradeço também a minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Iwanne Lima Coelho, uma amiga acima de tudo, que me conduziu profissionalmente a ser quem eu sou hoje. Obrigado Iwanne, por acreditar no meu potencial, pela confiança depositada, pela paciência em todo o meu processo de formação acadêmica/profissional. Sou imensamente grato por ter você em minha vida para me conduzir no árduo caminho da pesquisa, por me mostrar que somos capazes de alcançar grandes objetivos quando estamos dispostos a trabalhar duro. Um dia você me falou: “A coisa mais importante que alguém pode oferecer para outra pessoa é o seu tempo” e essas palavras me mostraram o quanto você dedicou o seu tempo, sem nenhuma obrigação, para meu processo de formação. Obrigado “Iwi”, que nossa amizade/parceria dure para sempre.

## EPÍGRAFE

*“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância”*

(Sócrates)

## SUMÁRIO

### Capítulo 1

<b>1. Fundamentação teórica</b> .....	<b>11</b>
1.1 Características gerais, nutritivas e econômicas do melão .....	11
1.2 Exigências particulares no plantio do melão .....	13
1.3 Potencial biotecnológico do melão .....	15
1.4 Características gerais das leveduras .....	16
1.5 Importância das leveduras para a saúde, agricultura e biotecnologia .....	18
1.6 Biofilme microbiano .....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>3. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>23</b>

### Capítulo 2

<b>Eficiência de leveduras da microbiota do melão amarelo (<i>Cucumis melo</i> L.) na produção e manutenção de biofilme</b> .....	<b>35</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>35</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>36</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>36</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>38</b>
Obtenção e seleção de leveduras .....	38
Identificação das leveduras .....	39
Preparo da curva padrão .....	42
Preparo de células e formação de biofilme .....	43
Delineamento experimental e análises estatísticas .....	44

<b>Resultados</b> .....	<b>45</b>
Identificação das leveduras .....	<b>45</b>
Formação, manutenção e eficiência de biofilme .....	<b>50</b>
<b>Discussão</b> .....	<b>53</b>
<b>Conclusões</b> .....	<b>60</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>60</b>
<b>Considerações Finais</b> .....	<b>66</b>



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**TABELA 1** - Composição nutricional de uma porção de 100 g de melão amarelo .. **12**

**TABELA 2** - Área, produção e rendimento de melão nos principais países ..... **13**

**TABELA 2** – Macromorfologia da forma, margem e a elevação de colônias de leveduras ..... **17**

**TABELA 4** - Macromorfologia de superfície, textura e brilho de colônias de leveduras ..... **17**

### CAPÍTULO 2

**TABELA 1** – Gêneros e espécies de leveduras incluídas nesse estudo ..... **40**

**TABELA 2** – Concentração média de cristal violeta e classificação das leveduras na eficiência de manutenção de biofilme ..... **50**

**TABELA 3** – Relatos de espécies de leveduras em diferentes frutos, tecidos vegetais e subprodutos de origem vegetal ..... **54**

**TABELA 4** – Relatos da literatura de casos clínicos e resistências a medicamentos por espécies isoladas e identificadas do melão amarelo (*Cucumis melo* L.) ..... **55**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1** - Principais tipos de melões cultivados no Brasil ..... 11

**FIGURA 2** - Etapas de formação de biofilme por leveduras ..... 21

### CAPÍTULO 2

**FIGURA 1** - Determinação da equação linear ..... 43

**FIGURA 2** - Relações filogenéticas entre espécies de *Meyerozyma*, por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequencias do gene ITS ..... 46

**FIGURA 3** - Relações filogenéticas entre espécies de *Metschnikowia*, por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequencias do gene ITS ..... 47

**FIGURA 4** - Relações filogenéticas entre espécies de *Candida*, por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequencias do gene ITS ..... 47

**FIGURA 5** - Relações filogenéticas entre espécies de *Rhodotorula*, por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequencias do gene ITS ..... 48

**FIGURA 6** - Relações filogenéticas entre espécies *Candida sorboxylosa* e espécies de *Pseudozyma*, por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequencias do gene ITS ..... 49

**FIGURA 7** - Relações filogenéticas entre espécies *Kodamaea* e *Hyphopichia* espécies de, por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequencias do gene ITS ..... 50

**FIGURA 8** - Frequência de isolados em relação a eficiência de produção e manutenção de camadas de biofilme durante 24, 48 e 72 h de incubação in vitro .. 52

**FIGURA 9** - Efeito do tempo na manutenção das camadas de biofilmes produzidas por leveduras avaliados quanto a concentração de cristal violeta ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) descorados das células presentes na camada de biofilme, no intervalo de 24 a 72 horas ..... 53

## RESUMO

O melão amarelo é uma Curcubitaceae bem estabelecida na agricultura brasileira. A microbiota epidérmica do melão abrange diversos organismos endofíticos, incluindo leveduras. As leveduras são fungos unicelulares que podem ser encontrados em diferentes ambientes, superfícies e substratos. Apresentam diversos mecanismos, dentre os quais vale ressaltar a importância da formação de biofilme, que se trata de uma camada bioprotetora com função de proteção às colônias. Não há um método universalmente padronizado para quantificar a capacidade de formação e manutenção de biofilme promovido por leveduras, desse modo, a metodologia varia de autor para autor. Porém, a utilização do cristal violeta em processos de corar células é o mais utilizado, contudo, muitas das avaliações apresentam apenas resultados qualitativos, baseados em um gradiente de cores. Alguns autores classificam dados quantitativos se baseando apenas nos valores de absorvância, entretanto esses valores não representam, significativamente, a eficiência de produção e manutenção de biofilmes. O objetivo deste trabalho é identificar a população de leveduras isoladas do pericarpo do melão amarelo (*Cucumis melo* L.) e verificar a eficiência quantitativa destas leveduras quanto a formação e manutenção de biofilme. As leveduras foram identificadas molecularmente a partir de filogenia baseada em sequências da região ITS do DNA. Foram submetidas a teste *in vitro* em placas de microtitulação do tipo Elisa por 24, 48 e 72 h, corados por cristal violeta obtendo-se porções líquidas das concentrações de células coradas. A partir da avaliação das alíquotas, em uma leitora de microplacas Elisa foram obtidos valores de concentrações, baseados nas diferentes colorações do cristal violeta. Utilizando uma equação adaptada observou-se os valores quantitativos de cada isolado, classificando-os em alta, média e baixa produção de biofilme. Todas as leveduras apresentaram capacidade de produção de biofilme em pelo menos um dos períodos avaliados, destacando-se os isolados da espécie *Candida orthopsilosis*. A eficiência das leveduras na produção e manutenção de biofilme nos períodos avaliados variou entre gênero, espécies e entre cepas da mesma espécie. Conclui-se que a microbiota de tecidos epidérmicos do melão apresenta riqueza de espécies de leveduras e demonstram diferentes padrões de eficiência na produção e manutenção de biofilme.

**Palavras-Chave:** Curcubitaceae; Fungos; Cristal Violeta; Biotecnologia

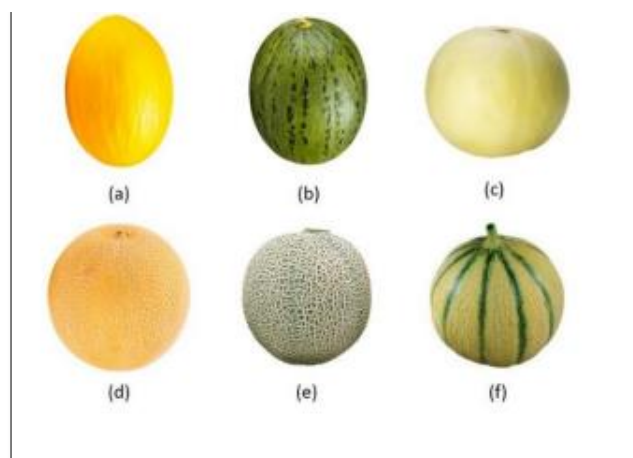
## 1. Fundamentação Teórica

### 1.1 Características gerais, nutritivas e econômicas do melão

O melão amarelo (*Cucumis melo* L.), pertencente à família Cucurbitaceae e ao gênero *Cucumis*, o qual compreende cerca de 34 espécies conhecidas (ALMEIDA, 2006). Trata-se de uma dicotiledônea de hábito perene, que possui um sistema radicular superficial formado por poucas raízes adventícias e caule herbáceo. O crescimento do melão amarelo é rasteiro e suas folhas, que apresentam tamanho variável, são simples, alternadas e ásperas, com presença de pelos, e o limbo pode ser orbicular, reniforme e pentalobadas com margens denteadas (KIRKBRIDE, 1993; MCCREIGHT *et al.*, 1993; de OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os frutos do meloeiro amarelo podem ser redondos, ovais e alongados, com tamanhos que variam de 20 a 25 cm de diâmetro, a casca pode ser lisa, enrugada ou rendilhada, seu peso e coloração variam de acordo com a variedade podendo ser branca, esverdeada, amarela, laranja e salmão (MOREIRA *et al.*, 2009).

Genericamente, no Brasil são cultivadas principalmente seis tipos de melão, com diversas variedades híbridas, sendo cultivadas, principalmente, as variedades *C. melo* var. *inodoros* e *C. melo* var. *cantalupensis* que correspondem, respectivamente, às características inodoros e aromáticos (MENEZES *et al.*, 2000) (Figura 1).

**Figura 1.** Principais tipos de melões cultivados no Brasil: (a) Melão Amarelo; (b) Melão Pele de Sapo; (c) Melão Honey Dew; (d) Melão Gália; (e) Melão Cantaloupe; (f) Melão Charentais.



Fonte: (Adaptado de CUNHA, 2019)

Entre essas variedades comercializadas no Brasil, o melão amarelo tipo valenciano, de origem espanhola, destaca-se por ser a variedade mais produzida e consumida. Os frutos dessa variedade são arredondados, com casca amarela, pouca espessa e bastante resistente ao processo de transporte e armazenamento, o que por sua vez, confere a essa variedade destaque e preferência de mercado, principalmente para exportação (MOREIRA *et al.*, 2009).

Estima-se que, no Brasil, o melão foi introduzido pelos escravos, no século XVI, mas não representava interesse agrícola e econômico. Apenas no século XIX, quando a cultura foi reintroduzida pelos europeus, o melão passou a ter seu plantio expandido nas regiões Sul e Sudeste para fins comerciais (NAKAMEA, 2004; MOREIRA *et al.*, 2009).

O melão, quando imaturo, é utilizado em saladas, cozidos, ensopados e maduros são consumidos frescos, em conservas, caldas ou geleias (McCREIGHT *et al.*, 1993) e podem ser utilizados na fabricação de bebidas alcoólicas fermentadas (BESSA *et al.*, 2018). Nutricionalmente, uma porção de 100 g de melão cru representa 89,82 g de água; um valor energético de 36 kcal; 0,54 g de proteína; 9,09 g de carboidratos e 0,8 g de fibra alimentar. Nessa mesma porção de melão, o potássio é o nutriente majoritário, com 228 mg, seguido por sódio, fósforo, magnésio, cálcio, ferro e zinco, destacando-se as vitaminas C e B6 (Tabela 1) (UNIFESP, 2016). Em conjunto, esses minerais, vitaminas e açúcares associados a um alto percentual de água, tornam o melão cada vez mais apreciável, com predileção ao consumo *in natura* por pelo menos 85% dos consumidores (ABRAHÃO *et al.*, 2009).

**Tabela 3.** Composição nutricional de uma porção de 100 g de melão amarelo (*Cucumis melo* L.).

Composição	Conteúdo	Composição	Conteúdo
Umidade (%)	89,82	Potássio (mg)	228,00
Energia (kcal)	36,00	Fósforo (mg)	10,00
Proteína (g)	0,54	Magnésio (mg)	6,00
Carboidratos (g)	9,09	Sódio (mg)	11,20
Fibra alimentar (g)	0,80	Ferro (mg)	0,2
Vitamina C (mg)	8,70	Cálcio (mg)	2,9
Vitamina B6 (mg)	0,09	Zinco (mg)	0,1

Fonte: UNIFESP (2016).

A produção de melão representa 1,7% da área cultivada no mundo e 2,2% da produção agrícola mundial, das quais 73% dessa produção está concentrada na Ásia

(KYRIACOU *et al.*, 2018). O Brasil é o 11<sup>o</sup> no ranking mundial de produção de melão (FAOSTAT, 2018) (Tabela 2). Em 2018 havia 23.342 hectares de área agrícola brasileira plantada com melão onde 89,84% dessas áreas estão distribuídas pelo Nordeste, com destaque ao estado do Rio Grande do Norte, o maior produtor da região (IBGE, 2018).

**Tabela 4.** Área, produção e rendimento de melão nos principais países, em 2013 (Embrapa, 2017)

País	Área (ha)	Produção (t)	Produtividade (t há <sup>-1</sup> )
China	425.050	14.336.814	33,73
Turquia	100.578	1.699.550	16,90
Irã	80.211	1.501.411	18,72
Egito	44.500	1.020.679	22,93
Índia	39.682	1.000.000	25,20
Estados Unidos	33.508	986.066	29,42
Espanha	26.700	857.000	32,10
Casaquistão	37.100	774.190	20,86
Marrocos	21.586	700.034	32,43
Guatemala	25.340	569.050	22,45
Brasil	22.021	565.900	25,70
Mundo	1.185.303	29.462.541	24,85

Fonte: FAO (2015)

## 1.2 Exigências particulares no plantio do melão

Mesmo sendo produzido em diferentes partes do planeta, o meloeiro apresenta certas exigências, que influenciam e podem limitar drasticamente o seu cultivo. Alguns dos fatores mais importantes são: a temperatura, a umidade relativa do ar e a disponibilidade hídrica, que afetam diretamente a espessura e a qualidade da polpa do fruto (FARIA *et al.*, 2015). Outro fator limitante é a exigência nutricional, por isso sugere-se a complementação com potássio para proporcionar um maior rendimento na produtividade (BARDIVIESSO *et al.*, 2015). Além dos fatores mencionados acima, vale ressaltar que o melão é muito sensível a acidez do solo, apresentando maior aptidão em solos com pH entre 6,0 a 6,5, por isso, em solos ligeiramente ácidos, recomenda-se a prática da calagem para promover a neutralização do alumínio trocável ( $Al^{3+}$ ) e o aumento da disponibilidade de fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e molibdênio (Mo) (COSTA, 2017).

Acerca dos fatores fitossanitários na cadeia produtiva do melão, as incidências de pragas e doenças configuram-se como fatores limitantes de extrema importância, principalmente as doenças causadas por fungos (PUJARI *et al.*, 2013). Esses patógenos podem ser introduzidos a partir de sementes infectadas, podendo influenciar diferentes fases do ciclo de desenvolvimento da planta, bem como na pós-colheita (SARKAR, 2016). Na cultura do melão, a incidência de doenças ocorre principalmente nos órgãos radiculares por ação de fungos como *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* (PORTO *et al.*, 2020).

Estima-se que 25% das perdas de produção mundial de melão são exclusivamente causadas por doenças (LUGTENBERG, 2015). Essa expressiva restrição e impacto aos sistemas de produção ocorre porque o meloeiro é, naturalmente, suscetível a patógenos como vírus, bactérias e fungos (O'BRIEN, 2017). Diante da diversidade de fitopatógenos que podem incidir sobre a cultura do melão, o sistema produtivo convencional tornou-se dependente do uso de produtos químicos, para garantir uma produção estimada (CARDON *et al.*, 2016).

Na busca de métodos que possam ser aplicados para reduzir ou mesmo substituir o uso de defensivos químicos, alguns métodos mostram-se promissores, como a refrigeração controlada na pós-colheita (TERAO *et al.*, 2007), utilização de óleos essenciais (FREIRE *et al.*, 2010), uso de extratos etanólicos vegetais (MEDEIROS *et al.*, 2011), incorporação de fungos micorrizos ao solo (SARAIVA *et al.*, 2012), compostos bioativos de bactérias (SANTOS *et al.*, 2006), tratamento de sementes via bactérias epifíticas e endofíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2006), entre outros métodos. Outra forma comumente utilizada pelos produtores, para evitar perdas expressivas em suas plantações e danos econômicos de produção, é a utilização de plantas geneticamente melhoradas. Como exemplo, temos algumas cultivares desenvolvidas com características resistentes a espécies do gênero *Fusarium*: AF 4945, Durasol, Goldex, Gladial, Hibrix, Iracema, Natal, Raysol, Soleares, Tikal; do tipo Pele de Sapo: Astúria, Grand Prix, Ibérico, Jabalón, Medellín, Sancho, Acclaim, Torreon, Caribbean Gold, Cabbean Pearl e Florentino e o tipo Gália: Amaregal, Ciro e Yelogal (COSTA, 2017).

Sem dúvida a variedade melão amarelo desponta na comercialização e consumo, em relação as demais variedades comercializadas. Contudo, vale ressaltar algumas variedades que apresentam importantes características que ultrapassam os quesitos sabor e riqueza à saúde. O melão amargo, por exemplo, possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-cancer, anti-diabética, antibacteriana, anti-obesidade

e imunomoduladora (DANDAWATE *et al.*, 2016). Essa fruta, além do tradicional uso do mesocarpo como principal região comestível, apresenta uma fonte de fibra alimentar em sua casca e as sementes concentram níveis representativos de proteínas, fibras e minerais (MALLEK-AYADI, 2017).

### 1.3 Potencial biotecnológico do melão

O melão apresenta diversos potenciais biotecnológicos, que o torna uma cultura de aproveitamento máximo. São diferentes potenciais relacionados a linhas de pesquisas distintas como a remoção de arsênicos de águas subterrâneas, um elemento químico tóxico de alta letalidade, a partir de suas cascas (SHAKOOR, 2018), a produção de carvão ativado, tendo como fonte as faixas do tecido epidérmico ao tecido endodérmico (ELAIYAPPILLAI *et al.*, 2019), a disponibilização de moléculas bioativas e carotenoides em seu subproduto (GÓMEZ-GARCÍA *et al.*, 2020).

Os subprodutos do melão também são utilizados como suplementos alimentares: em rações para ovinos (LOUSADA JUNIOR *et al.*, 2005); em ações sinérgicas para a silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), juntamente com as suas cascas (POMPEU *et al.*, 2002); como substituto ao milho para a dieta de ovinos, sem influenciar na redução do ganho de peso do animal (LIMA *et al.*, 2012); e com possibilidades de uma substituição de até 100% da ração industrial de cordeiros (COSTA *et al.*, 2011).

As sementes detêm consideráveis quantidades de óleo com ácido graxos essenciais e biocompostos como polifenóis, fitoesteróis e tocoferóis (MALLEK-AYADI 2018), além de serem consideradas um potencial ingrediente alimentar. Os polifenóis são agentes antioxidantes, fornecem proteção contra doenças cardíacas, previne artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinal, além de impedir formação de coágulos sanguíneo e dar suporte no controle de açúcar no sangue (FALCÃO, *et al.*, 2007). Os fitoesteróis atuam reduzindo o colesterol e o LDL colesterol, (de MELO *et al.*, 2019) e os tocoferóis manejam o sistema imunológico, atuando contra doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (TANG, 2000; LA SILVA *et al.*, 2007). Os subprodutos das sementes são comprovadamente agentes poderosos no retardamento oxidativo em compostos lipídicos, por exemplo no óleo de soja (MALACRIDA *et al.*, 2007).

Naturalmente, as superfícies de diferentes órgãos vegetais possuem microbiotas compostas por microrganismos patogênicos e não patogênicos ao



hospedeiro. Tratando-se do melão, há relatos de fungos dos gêneros como *Phoma*, *Cladosporium* e *Fusarium* em sementes (DELWING *et al.*, 2007), leveduras, bolores (PINHEIRO *et al.*, 2005) e bactérias em polpas (ARRUDA *et al.*, 2004), cepas leveduriformes do gênero *Hanseniasporaspe* em suco (SOARES *et al.*, 2015) e fungos filamentosos e leveduras em fragmentos epidérmicos (ANTONIOLLI *et al.*, 2005).


















Considera-se endofíticos os microrganismos habitantes do interior de órgãos vegetais, por, pelo menos, uma fase de seu ciclo de vida, sem lhe causar danos nem doenças (BORGES, 1999; PIMENTEL *et al.*, 2006). Ecologicamente, fungos endofíticos atuam sinergicamente com seu hospedeiro vegetal. Endofíticos, como as leveduras, podem atuar no aumento da resistência do hospedeiro, impedindo, por exemplo, ataques de fungos fitopatogênicos a estruturas vegetais (TAECHOWISAN *et al.*, 2003).

#### **1.4 Características gerais das leveduras**

Os fungos são organismos cosmopolitas, eucarióticos, podendo ser unicelulares, no caso das leveduras, e multicelulares, quando filamentosos. Estão presentes em vegetais, animais, detritos, solo e água. Por muito tempo, esses microrganismos foram considerados vegetais. A partir de 1969, foi descoberto que os fungos são aclorofilados, não possuíam celulose na parede celular (exceto fungos aquáticos) e não eram capazes de armazenar amido como substância de reserva. Desde então passaram a ter seu próprio reino denominado Fungi (TRABULSI e ALTHERNUM, 2015; CAMPOS *et al.*, 2020).

As leveduras constituem-se de células eucarióticas, com diâmetros acima de 10 µm e apresentam morfologia oval ou cilíndrica e pertencem ao Sub-Reino Dykarya, sendo classificadas nos Filos Basidiomycota e Ascomycota (FEYDER *et al.*, 2015). Apresentam diversas formas morfológicas em suas colônias (Tabela 3; Tabela 4). Esses microrganismos compreendem cerca de 600 espécies, distribuídas principalmente no Filo Ascomycota. Têm o núcleo bem definido, podendo ser pequeno, esférico ou reniforme com localização variável, associado ao vacúolo nuclear, possuem plasmídeos e enzimas lisossômicas que digerem células danificadas (BLACK, 2002). A parede celular das leveduras destaca-se pelo seu efeito probiótico, pois não pode ser digerida pelo organismo animal é, portanto, capaz de estimular o desenvolvimento e a atividade metabólica de bactérias comuns ao trato digestório (ZAINÉ, 2014).

**Tabela 5.** Macromorfologia quanto a forma, margem e a elevação de colônias de leveduras (adaptado de Madigan *et al*, 2010).

Forma		Margem		Elevação	
Puntiforme		Inteira / lisa		Achatada	
Filamentosa		Lobada		Elevada	
Irregular		Dentada		Convexa	
Lenticular		Ondulada		Pulvinada	
Circular		Filamentosa		Umbiculada	
Rizóide		Encaracolada			

**Tabela 4.** Macromorfologia quanto a superfície, textura e brilho de colônias de leveduras (adaptado de Madigan *et al*, 2010).

Superfície	Textura	Brilho
Lisa	Cremosa	Brilhante
Polvilhada	Mucosa	Opaca
Rugosa	Filamentosa	
Estriada	Farinosa	
Peluda	Consistente	
Setoreada	Pastosa	
Pliçada		
Verrugosa		
Canelada		

As leveduras apresentam reprodução assexuada por brotamento ou fissão. Quando por brotamento, a célula parental desenvolve uma protuberância, denominada broto, em sua superfície celular. Este broto se alonga, o núcleo parental se divide e um desses núcleos desloca-se até o broto, produz-se o material da parede celular entre o broto e a célula parental e finalmente o broto acaba se separando. Quando por fissão, há um alongamento da célula parental, o núcleo divide-se, e duas células-filhas são produzidas a partir da célula inicial, denominada célula mãe (TORTORA *et al.* 2016). ...

### **1.5 Importância das leveduras na saúde, agricultura e biotecnologia**

As leveduras estão entre os primeiros microrganismos domesticados pelos homens, com relatos do seu uso na produção de pão e cerveja vivenciado pela civilização egípcia. Em meados de 1680, o holandês Anton Van Leeuwenhoek, comerciante de tecidos, cientista e construtor de microscópios, realizou as primeiras observações microscópicas de células de leveduras. Apenas em 1837, Louis Pasteur constatou que a fermentação alcoólica seria promovida por leveduras (PASTEUR, 1860).

Populações de leveduras podem ser encontradas em diferentes ambientes, seja em superfícies bióticas ou abióticas, seja vivendo em harmonia com seu hospedeiro ou atuando como patógeno. O gênero *Candida*, por exemplo, já foi relatado em pera, citrino, carambola, ameixa, melão (HISIU-JUNG, 2017) e tomate (ROBL *et al.*, 2014), sem causar danos aos hospedeiros. Por outro lado, este mesmo gênero está intimamente relacionado a infecções hospitalares (NIARÉ-DOUMBO *et al.*, 2014) com espécies pertencentes ao complexo de doença *Candida parapsilosis* (CANTÓN *et al.*, 2011) e apresentando resistência a antifúngicos como anfotericina B, demonstrando alta capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável e ao látex FERREIRA *et al.*, 2019).

Há relatos de leveduras encontradas no milho (ABE *et al.*, 2015), maçã (WEI *et al.*, 2017), kiwis (NIU *et al.*, 2016), mamão, cacau, banana, rambutão (JACQUES & CASAREGOLA, 2019), pêssego (HALL *et al.*, 2018), cereja (KESMEN, OZBEKAR & BUYUKKIRAZ, 2018), pepino (HIRAI & KAWASUMI, 2020), cana-de-açúcar, arroz (KHUNNAMWONG *et al.* 2019) entre outros. Além de estarem presentes em diversos frutos, as leveduras

também são frequentes em diversas florações, por exemplo, em camélia (KANPIENGLAI *et al.*, 2016), rosa damascena, rosa do damasco (CORBU; VASSU & CSUTAK, 2019), em néctares de flores silvestres (VEGA; ALBALADEIO & LACHANE, 2018), flores de manga, goiaba, romã, limão, eucalipto e petúnia (MOUBASHER; ABDEL-SATER & ZEINAB, 2018).

As leveduras possuem diversas características e potenciais que as tornam promissoras biotecnologicamente na produção de biocombustíveis, enzimas, biosurfactantes e carotenoides (LYMAN *et al.*, 2019), por exemplo. Apresentam potenciais relevantes na biodegradação de micotoxinas, tal como aflotoxinas (TAHEUR *et al.*, 2020), que são um risco à saúde; no processo de fermentação para produção de vinho, com cepas termotolerantes (AMOIKON *et al.*, 2018); e na indústria da cerveja, com a histórica atuação do bem sucedido gênero *Saccharomyces* (ROSA & AFONSO, 2015).

Uma importância na área da saúde são as habilidades de resistência das leveduras a antifúngicos, tais como fluconazol (YANG *et al.*, 2009), 5-flucitosina (YANGHUA *et al.*, 2010), anfotericina B (FERREIRA *et al.*, 2019), antifúngicos azólicos e griseofulvina (MUKHERJEE *et al.*, 2014). Esta indiscutível competência em resistir a antifúngicos é, corriqueiramente, relacionada com a capacidade de produção de biofilme (MAZARI *et al.*, 2015).

Esses microrganismos possuem potencial inibitório que pode ser aproveitado na contenção de fungos filamentosos, como o *Penicillium expansum* (COELHO *et al.*, 2011), *Fusarium graminearum* (de OLIVEIRA *et al.*, 2015) e no controle de bactérias como *Pectobacterium carotovorum* (MELLO *et al.*, 2011). As leveduras destacam-se como antagonistas por serem efetivos competidores de nutrientes, por rapidamente colonizar fermentos, podendo até induzir o crescimento e a resistência do vegetal, bem como na sua eficiência em produzir enzimas líticas (SILVA *et al.*, 2014).

Alguns exemplos do potencial de levedura ao controle de fitopatógenos são as espécies *Rhodotorula glutinis*, detentora de um ótimo potencial inibitório sobre o desenvolvimento da antracnose em pimentão (VIEIRA & SANTOS, 2015), *Metschnikowia drosophilae*, que inibe por competição o crescimento de *Botrytis* em videira e morango, além do controle da moniliose de pêssego (BOULY *et al.*, 2018) e *Saccharomyces cerevisiae*, no controle efetivo de doenças foliares e de flores causadas por *Mycosphaerella fragariae*, *Dendrophoma obscurans* e *Colletotrichum acutatum* (GOUVEA *et al.*, 2009).

Outra característica marcante das leveduras é a produção de micotoxinas, capazes de inibir microrganismos uni ou pluricelulares. Uma destas substâncias, de

natureza proteica, denomina-se fator *killer*, toxina *killer* ou proteínas *killer* (BENDOVÁ, 1986; CÂNDIDO *et al.*, 1995). Associado ao potencial biocontrolador, o fator *killer* pode atuar na inibição de fitopatógenos, a exemplo, sobre o *Botrytis cinerea* (de OLIVEIRA *et al.*, 2011). Também demonstra potencial de atividade fermentativa (de LIMA *et al.*, 2007) e inibem bactérias contaminantes de processos fermentativos alcoólicos (MENEHIN *et al.*, 2010). Aplicam-se também sob a eliminação de leveduras patogênicas a humanos do gênero *Candida* (ROBLEDO-LEAL *et al.*, 2018), contra fungos dermatófitos (LANDELL *et al.*, 2007), antagonizam *Candida albicans* de cavidades bucais (RIBEIRO *et al.*, 2007) entre outras aplicações.

A indução de resistência de plantas, por meio da ação de leveduras, também é uma característica bastante explorada, tal como *Saccharomyces cerevisiae* em plântulas de pepineiro resistentes a *Colletotrichum lagenarium* (ZANARDO *et al.*, 2009), em frutos de morangos inoculados com *Rhizopus nigricans* (BENDO & VIECELLI, 2009) e em eucaliptos, reduzindo a severidade da ferrugem causada por *Puccinia psidii* (BOAVA *et al.*, 2010). O gênero *Saccharomyces* também atua na indução à produção de fitoalexinas em sorgo, soja (STANGARLIN *et al.*, 2010), feijoeiro (MULLER *et al.*, 2011), morangueiro (GOUVEA *et al.*, 2009) entre outros hospedeiros.

Outro importante mecanismo é a produção enzimática. Esse fator reafirma a importância das leveduras no campo da biotecnologia, visto que estas expressam enzimas como amilase (BASTOS, *et al.*, 2015), configurando-as como promissoras produtoras de álcool (COELHO *et al.*, 2020). As enzimas catalase, beta-glucosidase, protease, lipase (NOGUEIRA *et al.*, 2012) e beta-galactosidase (HEIDTMANN *et al.*, 2012), também fazem parte da variedade enzimática produzidas por leveduras.

## 1.6 Biofilme microbiano

Biofilmes são descritos como uma matriz polimérica, aderidas sobre diferentes tipos de superfícies sólidas, circundando colônias que, geralmente, estão submersas em meio líquido. Biofilmes também podem ser configurados por um amontoamento de células de origens microbianas e pelos produtos gerados na excreção de substâncias poliméricas extracelulares dessas células (BARROS, 2009; LANGER *et al.*, 2018). Além das leveduras as bactérias, protozoários e fungos filamentosos exibem capacidade de formação de biofilme (HARDING *et al.*, 2009).

O processo de formação de biofilme por leveduras ocorre em cinco etapas (HA, 2013; TAN *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2003; DORIA *et al.*, 2015). Inicia-se com a adesão de células em superfícies bióticas e abióticas via interações físico-químicas, em seguida acontece o agrupamento das células dentro de uma matriz extracelular polimérica. Posteriormente, sucede a formação de uma camada basal de micro colônias e, conseqüentemente, o aumento da matriz polimérica induzindo a organização de agregados em multicamadas. Na última etapa, ocorre a maturação das células que estão sobre a superfície e essa maturação ocasiona a liberação de células que ficarão sujeitas à formação de um novo biofilme (BLANKENSHIP & MITCHELL 2006; SUN *et al.*, 2015) (Figura 2).

**Figura 2.** Etapas de formação de biofilme por leveduras de acordo com (Blankenship & Mitchell 2006; Sun *et al.*, 2015). Ilustrado por Ribeiro, 2016)



O mecanismo de formação e manutenção de biofilmes é estudado por diferentes perspectivas, a exemplos, a relação entre resistências bacterianas e a capacidade de produção de biofilme (QI *et al.*, 2016), gama de leveduras antagônicas a antifúngicos, tais quais fluconazol e anfotericina (ZHRAN *et al.*, 2015) e a contenção do desenvolvimento de doenças em frutos, como a manga (*Mangifera indica* L.) sob ataques de *Botryosphaeria dothidea* e contida por *Meyerozyma guilliermondii* (TERAO & HALFELD-VIEIRA, 2017).

O perfil do caráter produtor de biofilme, produzido por leveduras, pode variar entre gêneros, espécies (TREVIÑO-RANGEL *et al.*, 2015) e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (FERREIRA *et al.*, 2019). A etapa crucial para o sucesso na produção deste biopolímero se dá durante o processo de adesão celular via interações célula-

célula e/ou célula-substrato (WILLAERT, 2018), uma vez que essa bioadesão seja inibida, a produção de biofilme é interrompida (INÉS & DHOUBA, 2015).

O aumento gradual do estresse sobre as leveduras está diretamente relacionado ao aumento na produção de biofilme (SEMLALI *et al.*, 2014). Os principais fatores estressores são: a idade da cultura, os nutrientes disponíveis, alterações no pH (SHIBATA, OBASE, ITOH & AMEMIYA, 2018), salinidade no meio (SOLIERI *et al.*, 2016), metabólitos secretados pela própria cepa, como o etanol, ácido succínico e glicerol (MEERTS *et al.*, 2018), que por sua vez provocam intoxicação às colônias.

Ao longo dos anos, vários protocolos foram desenvolvidos e aprimorados para avaliar a formação de biofilme. Dentre tantos, os mais usuais são os que utilizam microplacas de 96 poços, como aparato para desenvolvimento das colônias, associados a utilização de corantes como o cristal violeta, safranina e resazurina, para observação das camadas de biofilme (HANEY *et al.*, 2018; CAIXETA *et al.*, 2019). Diversos autores comparam métodos para avaliar as leveduras quanto a produção de biofilme e muitos observaram que o uso de cristal violeta é efetivo na quantificação de biomassa de biofilme (STIEFEL *et al.*, 2016) e o método da redução de sal tetrazólico responde bem na avaliação de atividade celular (ZHRAN *et al.*, 2015), porém, ambas técnicas se complementam (XU *et al.*, 2016).

A avaliação experimental baseada no uso do corante cristal violeta, afere-se os valores de absorvância via espectrofotômetro. Entretanto, a calibração da densidade óptica no instrumento aferidor não segue um padrão comum, podendo variar em: 550 nanômetros (nm) (RAJENDRAN *et al.*, 2010), 570 nm (NUNES, BIZERRA, FERREIRA & COLOMBO, 2013), 590 nm (FRACCHIA *et al.*, 2010), 595 nm (LEON-ROMERO *et al.*, 2016) e 620 nm (INTO *et al.*, 2020).

Além da calibração da densidade óptica no espectrofotômetro, outro fator que varia de autor para autor é a interpretação e categorização dos indivíduos testados a partir da concentração de cristal violeta (CCV). Para Ferreira (2019), valores de CCV abaixo de 0,036 classifica o isolado como fraco produtor de biofilme, porém para Rajendran (2010) valores de CCV abaixo de 0,15 representa um perfil de cepa com baixo potencial de produção do biopolímero, sendo que ambos utilizaram a calibração de densidade óptica em 550 nm.

Um outro fator crucial, para esse tipo de análise é o período de avaliação, visto que a curva de crescimento pode ser homogênea para um grupo ou específica para um indivíduo, condicionando-se em aspectos de aptidões ambientais e genéticos

(HERRICKS *et al.*, 2017). Uma mesma espécie, por exemplo *Candida albicans*, pode apresentar maior caráter produtivo de biofilme em 24 (RAJENDRAN *et al.*, 2010), em 48 (FRACCHIA *et al.*, 2010) e em 72 horas (SEMLALI *et al.*, 2014) dependendo das condições ambientais a qual se encontra. Outro exemplo a ser observado é o caso em *Saccharomyces cerevisiae* que pode apresentar o pico na massa celular em 24 (LIU *et al.*, 2016) e em 56 horas (JIANG, XU & CHEN, 2019).

Diante das divergências quanto aos métodos de avaliações na produção de biofilme, alguns autores recorrem a uma opção mais básica, considerando apenas se o isolado avaliado pode ser considerado como positivo ou negativo (SHEIK *et al.*, 2015).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Objetivou-se neste trabalho identificar as leveduras isoladas do pericarpo do melão amarelo *C. melo* e verificar a eficiência quantitativa destas leveduras quanto a formação e manutenção do biofilme.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente as cepas de leveduras isoladas do pericarpo do melão amarelo;
- Determinar *in vitro* a eficiência das leveduras isoladas do pericarpo do melão amarelo na formação e manutenção de biofilme em 24, 48 e 72 h.

## 3. REFERÊNCIAS

ABE, C. A. L., FARIA, C. B., DE CASTRO, F. F., DE SOUZA, S. R., SANTOS, F. C. D., DA SILVA, C. N., ... & BARBOSA-TESSMANN, I. P. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International journal of molecular sciences*, Maringá, PR, n. 7, p. 15328-15346, jul. 2015.

ABRAHÃO, C., MIGUEL, A. C. A., DIAS, J. R. P. S., SPOTO, M. H. F., & SILVA, P. P. M. D. Aplicação do método QDF na avaliação do perfil do consumidor de melão amarelo. *Food Science and Technology*, Campinas, SP, n. 4, p. 716-720, dez. 2009.



ALMEIDA, Domingos. *Manual de culturas hortícolas* - Volume II. Lisboa, Portugal: Editorial Presença, n. 4, p. 716-720, abr. 2006.

AMOIKON, T. L. S., AKÉ, F. M., BAKAYOKO, M., DJÉNI, T. D., MOUGO, E. B. L., & DJÈ, M. K. Physiological profiles of indigenous yeasts isolated from raffia wine originated of côte d'ivoire. *J Glob Biosci*, Abidjan, Costa do Marfim, n. 7, p. 5459-5474. 2018.

ANTONIOLLI, L. R., BENEDETTI, B. C., SOUZA FILHO, M. D. S. M. D., & BORGES, M. D. F. Effect of sodium hypochlorite on the microflora of fresh-cut 'Pérola' pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, n. 1, p. 157-160, abr. 2005

ARRUDA, M. C. D., JACOMINO, A. P., SPOTO, M. H. F., GALLO, C. R., & MORETTI, C. L. Conservação de melão rendilhado minimamente processado sob atmosfera modificada ativa. *Food Science and Technology*, Campinas, SP, n. 1, p. 53-58, mar. 2004.

BARDIVIESSO, D. M, MARUYAMA, W. I, PESSATO, L. E, PEREIRA, A. C. B., & MODESTO, J. H. (2015). Potassium fertilization in the production of two melon cultivars. *Journal of Neotropical Agriculture*, Mato Grosso do Sul, MS, n. 1, p. 32-40, dez. 2015.

BASTOS, C. M. S., CARREIRO, S. C., COSTA, S. T. C., de ABREU-LIMA, T. L., & ZUNIGA, A. D. G. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, RS, n. 3, p. 1679-2343, fev. 2015.

BENDO, M. I., & VIECELLI, C. A. Controle biológico de *Rhizopus nigricans* em pós-colheita de morango pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e leite *in natura*. *Rev Faculdade Assis Gurgacz*, Cascavel, PR, n. 3, p. 23-35. 2009.

BENTO, C. V., & de ALMEIDA, J. B. (2006). Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º Parte - As Leveduras. *Revista Analytica*, n. 25, p. 36-42. 2006.

BESSA, M. A. D., OLIVEIRA, E. N. A. D., FEITOSA, B. F., FEITOSA, R. M., ALMEIDA, F. L. C., & OLIVEIRA NETO, J. O. D. Bebida alcoólica fermentada de melão (*Cucumis melo L.*): processamento e caracterização. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, SP, e.2017217.2018, mai. 2018.

BLACK, Jacquelyn G. *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

BOAVA, L. P., KUHN, O. J., PASCHOLATI, S. F., DI PIERO, R. M., & FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, SP, n. 2, p. 168-172, abr. 2010.

BOULY, K., WEERT, S. D., & VERFAILLE, T. Development of a yeast *Metschnikowia fructicola* for the control of pre- and post-harvest diseases in stone fruits, vine and soft fruits. *Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Végéphyt*, p. 303-312, dez. 2018.

CAIXETA, M. A. B., BRAGA, A. SILVA., ALMEIDA, D. G. S., PINTO, O. G., SANTANA, E. S., NAVES, P. L. F. (2019). Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enciclopédia Biosfera*, Goiana, GO, n. 29; p. 1870-1880, jun. 2019.

CAMPOS, T., COSENTINO, C., SIMIONI, P. U., & UGRINOVICH, L. A. Evaluation of the behavior of yeasts of the genus *Candida* to antifungal drugs. *Science & Innovation*, n. 5. 2020.

CÂNDIDO, R. C., FISCHMAN, O., ZAROR, L., & ITO, I. Y. Sistema killer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, SP, n. 4, p. 321-324, dez. 1995.

CANTÓN, E., PEMÁN, J., QUINDÓS, G., ERASO, E., MIRANDA-ZAPICO, I., ÁLVAREZ, M., ... & YAGÜE, G. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Valencia, Spain, n 12, p. 5590-5596, dez. 2011.

CARDON, C. H., SANTOS, G. R. D., TSCHOEKE, P. H., SÁGIO, S. A., DALCIN, M. S., & AGUIAR, R. W. D. S. Effectiveness of fungicides associated with insecticides on gummy stem blight and melon yield. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, SP, n. 1, p. 79-84. 2016.

COELHO, A. L. S., SCARIOT, F. O., de ABREU-LIMA, T. L., & CARREIRO, S. C. Produção de amilases por levedura selvagem em resposta à diferentes condições de cultivo. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, Tocantins, TO, n. 3, p. 179-186, dez. 2020.

COELHO, A. R., de ANDRADE NÓBREGA, G. M., PAGNOCCA, F. C., HOFFMANN, F. L., HARADA, K. I., & HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrárias*, São José do Rio Preto, SP, n. 1, p. 1879-1892, dez. 2011.

COSTA, R. G., LIMA, C. A. C., MEDEIROS, A. N., LIMA, G. D. C., MARQUES, C. A. T., & SANTOS, N. D. Características de carcaça de cordeiros Morada Nova alimentados com diferentes níveis do fruto-refugo de melão em substituição ao milho moído na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, João Pessoa, PB, n. 4, p. 866-871, mai. 2011.

DANDAWATE, P. R., SUBRAMANIAM, D., PADHYE, S. B., & ANANT, S. Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chinese journal of natural medicines*, Pune, India, n. 2, p. 81-100, fev. 2016.

BARROS, J. D., NASCIMENTO, S. M. N., ARAÚJO, F. J. S., BRAZ, R. F. S., ANDRADE, V. S. & MONTEIRO, M. G. L. *Kodamaea* (*Pichia*) *ohmeri* fungemia in a

pediatric patient admitted in a public hospital. *Sabouraudia*, Natal, RN, p. 775-779, abr. 2009.

DE LIMA, J. R., Bruno, L. M., DA SILVA, J. L. A., & DE CASIMIRO, A. R. S. Potencial de utilização de leveduras "killer" para produção de cachaça. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, CE, n. 4, p. 366-371. 2007.

DE MELO, J. V. D., FORMIGA, M. W. M., DE ANDRADE, J. L., GOUVEIA, L. D. G., VIEIRA, J. K. B., GOMES, A. K. G. & DE SOUSA, M. N. A. Efeitos dos fitoesteróis para a prevenção de doenças. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, Patos, PB, n. 1, p. 27-31, mar. 2019.

DE OLIVEIRA, A. J., GIMENES, D. C., HIROZOAWA, M., MACAGNAN, R., & ONO, E. Y. S. (2015). Potencial antagonista de leveduras frente a *Fusarium graminearum*. *Blucher Biochemistry Proceedings*, Londrina, PR, n. 2, p. 382-382. 2015.

DE OLIVEIRA, A. V., RABELO, P. R., DA SILVA PORTES, C., & COELHO, A. R. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras killer visando aplicação em morangos pós-colheita. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, Francisco Beltrão, PR, n. 3, p. 353-364, nov. 2011.

DE OLIVEIRA, F. I. C., NUNES, A., SILVA, F., SILVA, G., & DE ARAGAO, F. A. S. A cultura do melão. *Embrapa Agroindústria Tropical (ALICE)*. 2017.

DE VEGA, C., ALBALADEJO, R. G., & LACHANCE, M. A. *Metschnikowia maroccana* fa, sp. nov., a new yeast species associated with floral nectar from Morocco. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Sevilla, Spain, p. 2028-2035. 2018.

DELWING, A. B., FRANKE, L. B., & BARROS, I. B. I. D. Qualidade de sementes de acessos de melão crioulo (*Cucumis melo* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, PR, n. 2, p. 187-194, ago. 2007.

FARIA, L. A., ELVIS, M. A. & SIQUEIRA, W. C. Quality of french honey fruits cultivated in a protected environment under different irrigation blades. *Brazilian Journal of Irrigated Agriculture*, n. 9, p. 357-365. 2015.

DORIA, A. C. O. C., SANTOS, T. B., FIGUEIRA, F. R., SORGE, C. D. P. C., BERNARDES, R. C., BATISTA, A. D. C. S., & KHOURI, S. Estudo comparativo de hemoculturas e cateteres positivos para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. *Revista Univap*, São José dos Campos, n. 38, p. 46-55, dez. 2016.

ELAIYAPPILLAI, E., SRINIVASAN, R., JOHNBOSCO, Y., DEVAKUMAR, P., MURUGESAN, K., KESAVAN, K., & JOHNSON, P. M. Low cost activated carbon derived from *Cucumis melo* fruit peel for electrochemical supercapacitor application. *Applied Surface Science*, Tamil Nadu, India, p. 527-538, mai. 2019.

FALCÃO, A. P., CHAVES, E. S., KUSKOSKI, E. M., FETT, R., FALCÃO, L. D., & BORDIGNON-LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. *Food Science and Technology*, Campinas, SP, n. 3, p. 637-642, jul. 2007.

FAOSTAT, Food and agriculture organization of the United Nations. Disponível em: <[www.fao.org/faostat/en/#home](http://www.fao.org/faostat/en/#home)> Acessado em 09 de outubro de 2020

FERREIRA, E. O., MENDES, I. N. V. F., MONTEIRO, S. G., CROSARA, K. T. B., SIQUEIRA, W. L., MOFFA, E. B., & MONTEIRO, C. A. Virulence properties and sensitivity profile of *Candida parapsilosis* complex species and *Kodamaea ohmeri* isolates from onychomycosis of HIV/AIDS patients. *Microbial pathogenesis*, São Luiz, MA, p. 282-292, jul. 2019.

FEYDER S. et al. Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *International Journal of Molecular Sciences*, Strasbourg, France, n. 1, p. 1509-1525, jan. 2015.

FRACCHIA, L., CAVALLO, M., ALLEGRONE, G., & MARTINOTTI, M. G. A Lactobacillus-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Appl Microbiol Biotechnol*, Novara, Italy, n. 2, p. 827-837. 2010.

GÓMEZ-GARCÍA, R., CAMPOS, D. A., AGUILAR, C. N., MADUREIRA, A. R., & PINTADO, M. Valorization of melon fruit (*Cucumis melo* L.) by-products: Phytochemical and Biofunctional properties with Emphasis on Recent Trends and Advances. *Trends in Food Science & Technology*, Coahuila, México, n. 99, p. 507-5019, mai. 2020.

GOUVEA, A. D., KUHN, O. J., MAZARO, S. M., MIO, M. D., LOUISE, L., DESCHAMPS, C. & FONSECA, V. D. C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, n. 4, p. 527-533, out. 2009.

HALL, M. E., LOEB, G. M., CADLE-DAVIDSON, L., EVANS, K. J., & WILCOX, W. F. Grape sour rot: a four-way interaction involving the host, yeast, acetic acid bacteria, and insects. *Phytopathology*, Hobart, Australia, p.1429-1442, jun. 2018.

HARDING, M. W., MARQUES, L. L., HOWARD, R. J., & OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in microbiology*, Alberta, Canada, n. 11, p. 475-480, nov. 2009.

HEIDTMANN, R. B., DUARTE, S. H., PEREIRA, L. P. D., BRAGA, A. R. C., & KALIL, S. J. (2012). Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, SP, n. 1, p. 41-49, mar. 2012.

HERRICKS, T., MASTRO, F. D., LI, S., AITCHISON, J. D. ODELAY: A large-scale method for multi-parameter quantification of yeast growth. *J. Vis. Exp.*, doi: 10.3791/55879, 125, jul. 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil> Acesso em 09 de out de 2020.

INÈS, M., & DHOUHA, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate research*, Tunisia, doi: 10.1016/2015.07.016, p. 59-69, out. 2015.

INTO, P., KHUNNAMWONG, P., JINDAMORAGOT, S., AM-IN, S., INTANOO, W., & LIMTONG, S. Yeast associated with rice phylloplane and their contribution to control of rice sheath blight disease. *Microorganisms*, Bangkok, Thailand, n. 8, p. 362. 2020.

JACQUES, N., & CASAREGOLA, S. Large biodiversity of yeasts in French Guiana and the description of *Suhomyces coccinellae* fa sp. nov. and *Suhomyces faveliae* fa sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, France, doi: 10.1099/ijsem.0.003369, p. 1634-1649. 2019.

JIANG, H., XU, W., & CHEN, Q. High precision qualitative identification of yeast growth phases using molecular fusion spectra. *Microchemical Journal*, Zhenjiang, PR China, doi: 10.1016/j.microc.2019.104211, dez. 2019.

KANPIENGJAI, A., CHUI-CHAI, N., CHAIKAEW, S., & KHANONGNUCH, C. Distribution of tannin-tolerant yeasts isolated from Miang, a traditional fermented tea leaf (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in northern Thailand. *International journal of food microbiology*, Chiang Mai, Thailand, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.044, p. 121-131. 2016.

KESMEN, Z., ÖZBEKAR, E., & BÜYÜKKIRAZ, M. E. (2018). Multifragment melting analysis of yeast species isolated from spoiled fruits. *Journal of applied microbiology*, doi:10.1111/jam.13645, p. 522-534, nov. 2018.

KHUNNAMWONG, P., LERTWATTANASAKUL, N., JINDAMORAKOT, S., SUWANNARACH, N., MATSUI, K., & LIMTONG, S. Evaluation of antagonistic activity and mechanisms of endophytic yeasts against pathogenic fungi causing economic crop diseases. *Folia Microbiologica*, Bangkok, Thailand, doi: 10.1007/s12223-019-00764-6, p. 573-590, dez. 2019.

KYRIACOU, M. C., LESKOVAR, D. I., COLLA, G., & ROUPHAEL, Y. Watermelon and melon fruit quality: The genotypic and agro-environmental factors implicated. *Scientia Horticulturae*, Nicosia, Cyprus, doi: 10.1016/j.scienta.2018.01.032, p. 393-408, abr. 2018.

LANDELL, M. F., POZZA, C. L., STOPIGLIA, C. D. O., DABOIT, T. C., HEIDRICH, D., SCROFERNEKER, M. L., & SILVA, P. V. D. Espectro de ação de leveduras Killer contra fungos dermatófitos. *Revista HCPA*, Porto Alegre, RS, n. 1, p. 27. 2007.

LANGER, L. T. A., DO CARMO, R. L., STAUDT, K. J., & ALVES, I. A. (2018). Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura. *Revista Interdisciplinar em*

*Ciências da Saúde e Biológicas*, Alto Uruguai e das Missões, RS, doi: 10.31512/ricsb.v2i2.2548, p. 1-15. 2018.

LEÓN-ROMERO, A., DOMÍNGUEZ-MANZANO, J., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., ARROYO-LÓPEZ, F. N., & JIMÉNEZ-DÍAZ, R. (2016). Formation of in vitro mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, Seville, Spain, n. 2, p. 689-695, nov. 2016.

LIMA, C. A. C. D., LIMA, G. F. D. C., COSTA, R. G., MEDEIROS, A. N. D., AGUIAR, E. M. D., & LIMA JÚNIOR, V. D. Efeito de níveis de melão em substituição ao milho moído sobre o desempenho, o consumo e a digestibilidade dos nutrientes em ovinos Morada Nova. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, n. 1, p. 164-171, jan. 2012.

LIU, X., JIANG, M., SUI, Q., LUO, S., & GENG, X. Optical fiber Fabry–Perot interferometer for microorganism growth detection. *Optical Fiber Technology*, Shandong, China, doi: 10.1016/j.yofte.2016.01.014, p. 32-37, jul. 2016.

LOUSADA JUNIOR, J. E., NEIVA, J. N. M., RODRIGUEZ, N. M., PIMENTEL, J. C. M., & LÔBO, R. N. B. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, n. 2, p. 659-669, p. 659-669, abr. 2005.

LYMAN, M. (Org.) et alii. *The Oleaginous Red Yeast Rhodotorula/Rhodospiridium: A Factory for Industrial Bioproducts*. London: Yeasts in Biotechnology, 2019.

MADIGAN, M. T. (Org.) et alii. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Artmed S.A., 2010.

MALACRIDA, C. R., ANGELO, P. M., ANDREO, D., & JORGE, N. Composição química e potencial antioxidante de extratos de sementes de melão amarelo em óleo de soja. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, CE, n. 4, p. 372-376, dez. 2007.

MALLEK-AYADI, S., BAHLOUL, N., & KECHAOU, N. Characterization, phenolic compounds and functional properties of *Cucumis melo* L. peels. *Food chemistry*, Sfaz, Tunisia, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.117, p. 1691-1697, abr. 2017.

MALLEK-AYADI, S., BAHLOUL, N., & KECHAOU, N. Chemical composition and bioactive compounds of *Cucumis melo* L. seeds: Potential source for new trends of plant oils. *Process Safety and Environmental Protection*, Sfaz, Tunisia, doi: 10.1016/j.psep.2017.09.016, p. 68-77, jan. 2018.

MAZARI, W., BOUCHERIT-OTMANI, Z., & BOUCHERIT, K. In vitro susceptibility of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against *Candida guilliermondii* biofilms, isolated from dentals units water pipes, under different growth phases. *Journal de mycologie medicale*, Tlemcen, Algeria, doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.027, p. 57-62, mar. 2015.

McCREIGHT, J. D., NERSON, H., & GRUMET, R. (1993). Melon: *Cucumis melo* L. *Genetic improvement of vegetable crops*, doi: 10.1016/B978-0-08-040826-2.50024-2, p. 267-294, dez. 1993.

MEDEIROS, E. V., VIANA, M. G., ALBUQUERQUE, C. C., VIANA, F. A., & SILVA, K. M. B. Extrato etanólico de Senna alata no controle de *Myrothecium roridum*, agente casual do cancro-de-mirotécio. *Planta daninha*, Viçosa, MG, n. 3, p. 577-583, set. 2011.

MEERTS, M., CERVERA, A. R., STRUYF, N., CARDINAELS, R., COURTIN, C. M., & MOLDENAERS, P. The effects of yeast metabolites on the rheological behaviour of the dough matrix in fermented wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, Leuven, Belgium, doi: 10.1016/j.jcs.2018.06.006, p. 183-189, jul. 2018.

MELLO, M. R. F., SILVEIRA, E. B., VIANA, I. O., GUERRA, M. L., & MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, n. 1, p. 78-83, mar. 2011.

MENEGHIN, M. C., REIS, V. R. & CECCATO-ANTONINI, S. R. Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. *Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, PR, n. 5, p. 1043-1050, set. 2010.

MENEZES, J. B., FILGUEIRAS, H. A. C., ALVES, R. E., MAIA, C. E., ANDRADE, G. D., ALMEIDA, J. D., & VIANA, F. M. P. Características do melão para exportação. *Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia*, Brasília, DF, p. 13-22. 2000.

MOUBASHER, A. H., ABDEL-SATER, M. A., & ZEINAB, S. M. Diversity of floricolous yeasts and filamentous fungi of some ornamental and edible fruit plants in Assiut area, Egypt. *Curr Res Environ Appl Mycol*, Assiut, Egypt, n. 1, p. 135-61, fev. 2018.

MUKHERJEE, S., MUKHERJEE, N., SAINI, P., GAYEN, P., ROY, P., & BABU, S. P. S. Molecular evidence on the occurrence of co-infection with *Pichia guilliermondii* and *Wuchereria bancrofti* in two filarial endemic districts of India. *Infectious diseases of poverty*, n. 1, p. 1-11, abr. 2014.

MÜLLER, S. F., STANGARLIN, J. R., & MEINERZ, C. C. 12430-A indução de resistência e seus efeitos em feijoeiro sob cultivo agroecológico. *Cadernos de Agroecologia*, n. 2. 2011.

NIARÉ-DOUMBO, S., NORMAND, A. C., DIALLO, Y. L., DEMBELÉ, A. K., THERA, M. A., DIALLO, D. & RANQUE, S. Preliminary study of the fungal ecology at the haematology and medical-oncology ward in Bamako, Mali. *Mycopathologia*, Bamako, Mali, n. 1-2, p. 103-109. 2014.

NIU, C., YUAN, Y., HU, Z., WANG, Z., LIU, B., WANG, H., & YUE, T. Accessing spoilage features of osmotolerant yeasts identified from kiwifruit plantation and processing environment in Shaanxi, China. *International journal of food microbiology*,

Yangling, Shaanxi, China, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.012, p. 126-133, set. 2016.

NOGUEIRA, F. A. M., MENDES, P. A. F., PEREIRA, J. A., & PEREIRA, E. Atividade enzimática de leveduras isoladas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes. *Actas Portuguesas de Horticultura-VI Simpósio Nacional de Olivicultura*, p. 315-321. 2012.

NUNES, J. M., BIZERRA, F. C., e FERREIRA, R. C., & COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, São Paulo, SP, n. 1, p. 382-389, jan. 2013.

OLIVEIRA, A. D., DOS SANTOS, M. H., DA SILVEIRA, E. B., GOMES, A., & MARIANO, R. D. L. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, n. 3, p. 373-377, set. 2006.

PASTEUR, L. *Mémoire sur la fermentation alcoolique*. Paris: Mallet-Bachelier. 1860.  
PIMENTEL, I. C., KUCZKOWSKI, F. R., CHIME, M. A., AUER, C. G., & JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta*, Paraná, PR, n. 1. p. 123-128, fev. 2006.

PINHEIRO, N. M. D. S., FIGUEIREDO, E. A. T. D., FIGUEIREDO, R. W. D., MAIA, G. A., & SOUZA, P. H. M. D. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, n. 1, p. 153-156, abr. 2005.

PORTO, M. A. F., AMBRÓSIO, M. M. D. Q., NASCIMENTO, S. R. D. C., CRUZ, B. L. S. D., & TORRES, T. M. Interaction between *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as pathogens that cause root rot in *Cucumis melo*. *Summa Phytopathologica*, Mossoró, RN n. 4, p. 355-360, fev. 2019.

QI, L., LI, H., ZHANG, C., LIANG, B., Li, J., WANG, L. & SONG, H. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, Beijing, China, doi: 10.3389/fmicb.2016.00483, p. 483, abr. 2016.

RAJENDRAN, R., ROBERTSON, D. P., HODGE, P. J., LAPPIN, D. F., & RAMAGE, G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*, Glasgow, UK, doi: 10.1007/s11046-010-9319-0, p. 229-235, mai. 2010.

RIBEIRO, L. H. D. F. Potencial biotecnológico do óleo essencial de *Vitex gardneriana* na prevenção e controle de biofilmes de espécies de *Candida* de importância clínica. 2016.

ROBL, D., THIMOTEO, S. S., de SOUZA, G. C. C. F., BEUX, M. R., DALZOTO, P. R., PINHEIRO, R. L., & PIMENTEL, I. C. Occurrence of *Candida orthopsilosis* in Brazilian



tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, SP, n. 1, p. 105-109. 2014.

ROBLEDO-LEAL, E., RIVERA-MORALES, L. G., SANGORRÍN, M. P., GONZÁLEZ, G. M., RAMOS-ALFANO, G., ADAME-RODRIGUEZ, J. M. & RODRIGUEZ-PADILLA, C. Identificação e suscetibilidade de isolados clínicos de *Candida* spp. a toxinas assassinas. *Jornal Brasileiro de Biologia*, Nuevo León, Mexico, n. 4, p. 742-749, nov. 2018.

ROSA, NA, & AFONSO, JC. The chemistry of beer. *Revista Química Nova*, São Paulo, SP, 37, doi: 10.5935/0104-8899.20150030, p. 98-105, jun. 2015.

SARAIVA, J. P. B., NOGUEIRA, D. R. S., JUNIOR, R. S., & ALBUQUERQUE, L. B. Efeito de doses de mycosim tri-ton no cultivo do melão e da melancia conduzido em dois solos naturalmente infestados. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, RN, n. 2, p. 11-15, jun. 2012.

SEMLALI, A., KILLER, K., ALANAZI, H., CHMIELEWSKI, W., & ROUABHIA, M. Cigarette smoke condensate increases *C. albicans* adhesion, growth, biofilm formation, and EAP1, HWP1 and SAP2 gene expression. *BMC microbiology*, Québec, Canada, n. 1, p. 1-9, mar. 2014.

SHAKOOR, M. B., NIAZI, N. K., BIBI, I., SHAHID, M., SHARIF, F., Bashir, S., ... & Rinklebe, J. Arsenic removal by natural and chemically modified water melon rind in aqueous solutions and groundwater. *Science of the Total Environment*, Faisalabad, Pakistan, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.218, p. 1444-1455, dez. 2018.

SHEIK, S., CHANDRASHEKAR, K. R., SWAROOP, K., & SOMASHEKARAPPA, H. M. Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Karnataka, India, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.08.006, p. 21-29, nov. 2015.

SHIBATA, K., OBASE, K., ITOH, K., & AMEMIYA, T. The effects of starvation and acidification on lag phase duration of surviving yeast cells. *Journal of biotechnology*, Kanagawa, Japan, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.04.007, p. 60-64, jun. 2018.

SOARES, M., BENEVIDES, M., SILVA, N., & PINHEIRO, A. Utilização de *hanseniaspora* sp isolada no suco do melão na fermentação alcóolica. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, Florianópolis, SC, n. 2, p. 23-29, out. 2015.

SOLIERI, L., VEZZANI, V., CASSANELLI, S., DAKAL, T. C., PAZZINI, J., & GIUDICI, P. Differential hypersaline stress response in *Zygosaccharomyces rouxii* complex yeasts: a physiological and transcriptional study. *FEMS yeast research*, Emilia, Italy, doi: 10.1093/femyr/fow063, p. 1-11, ago. 2016.

STANGARLIN, J. R., SCHULZ, D. G., FRANZENER, G., ASSI, L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., & Kuhn, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, SP, n. 1, p. 91-98, mar. 2010.

STIEFEL, P., ROSENBERG, U., SCHNEIDER, J., MAUERHOFER, S., MANIURA-WEBER, K., & REN, Q. Is biofilm removal properly assessed Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied microbiology and biotechnology*, St. Gallen, Switzerland, n. 9, p. 4135-4145, fev. 2016.

SUN L., LIAO K. & WANG D. Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. *Plos One*, Nanjing, China, n. 2: p. 117695, fev. 2015.

TAECHOWISAN, T., PEBERDY, JF, & LUMYONG, S. Isolamento de actinomicetos endofíticos de plantas selecionadas e sua atividade antifúngica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, n. 4, p. 381-385, fev. 2003.

TAHEUR, F. B., MANSOUR, C., JEDDOU, K. B., MACHREKI, Y., Kouidhi, B., ABDULHAKIM, J. A., & CHAIEB, K. Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. *Toxicon*, Monastir, Tunisia, doi: 10.1016/j.toxicon.2020.03.004, p. 76-83, mai. 2020.

TERAO, D., NECHET, K. L., & HALFELD-VIEIRA, B. A. Competitive and colony layer formation ability as key mechanisms by yeasts for the control Botryosphaeria dothidea fruit rot of mango. *Tropical Plant Pathology*, Jaguariúna, SP, n. 6, p. 451-457, set. 2017.

TERAO, D., DE OLIVEIRA, S. M. A., VIANA, F. M. P., & GONDIM, D. M. F. Refrigeração associada à sanitização no controle integrado da podridão em melão. *Revista Caatinga*, Petrolina, PE, n. 3, p. 121-128, set. 2007.

TORTORA, Gerard; CASE, Christine & FUNKE, Berdell. *Microbiologia*. 12<sup>o</sup>. ed. Artmed, 2016.

TREVIÑO-RANGEL, R. D. J., RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, I. P., ROSAS-TARACO, A. G., HERNÁNDEZ-BELLO, R., GONZÁLEZ, J. G., & GONZÁLEZ, G. M. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. *Revista iberoamericana de micología*, Nuevo León, Mexico, n. 3, p. 180-184, set. 2015.

UNIFESP. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Informática em Saúde. *Tabela de composição Química dos Alimentos* (TABNUT). Disponível em: <http://tabnut.dis.epm.br/alimento/09184/melao-cru>. Acesso em: 11 set. 2020.

WEI, J., NIU, C., LIU, B., YUAN, Y., & YUE, T. Identification and characterization of epiphytic yeasts on apples in China. *RSC advances*, n. 71, p. 44766-44772, set. 2017. WILLAERT, R. G. Adhesins of yeasts: protein structure and interactions. *Journal of Fungi*, Brussels, Belgium, n. 4, p. 119, out. 2018.

XU, Z., LIANG, Y., LIN, S., CHEN, D., Li, B., Li, L., & DENG, Y. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current microbiology*, Guangzhou, China, n. 4, p. 474-482, jun. 2016.

YANG, B. H., PENG, M. Y., HOU, S. J., SUN, J. R., LEE, S. Y., & LU, J. J. Fluconazole-resistant *Kodamaea ohmeri* fungemia associated with cellulitis: case report and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, Taipei, Taiwan, n. 6, p. 493-497, nov. 2009.

YANGHUA, Q., WEIWEI, W., YANG, L., JIAN, X., & QIAN, S. Isolation, identification, and antifungal susceptibility test for *Kodamaea ohmeri*: a case report on endocarditis. *Journal of Medical Colleges of PLA*, Shanghai, China, n. 4, p. 252-256, ago. 2010.

ZAHRAN, K. M., AGBAN, M. N., AHMED, S. H., HASSAN, E. A., & SABET, M. A. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. *Journal of medical microbiology*, Assiut, Egypt, n. 4, p. 375-381, fev. 2015.

ZANARDO, N. M. T., PASCHOLATI, S. F., & FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, n. 11, p. 1499-1503, nov. 2009.

## EFICIÊNCIA DE LEVEDURAS DA MICROBIOTA DO MELÃO AMARELO (*Cucumis melo* L.) NA PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE BIOFILME

Sergio Batista Ramos<sup>1</sup>; Iwanne Lima Coelho<sup>2</sup> & Delson Laranjeira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Email: sergiobaptistaramos@gmail.com; Universidade Federal Rural de Pernambuco

<sup>2</sup>Email: iwannecoelho@gmail.com; Universidade Federal Rural de Pernambuco

<sup>3</sup>Email: delson.laranjeira@ufrpe.br; Universidade Federal Rural de Pernambuco

### RESUMO:

Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade sésil de microrganismos, encapsulados por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, formados e encontrados em substratos bióticos e abióticos. Bactérias, protozoários, leveduras ou fungos filamentosos apresentam a capacidade de formação de biofilmes e as características dessa formação variam conforme o tipo de microrganismo envolvido. Esse trabalho objetivou contribuir para o conhecimento de espécies de leveduras presentes na microbiota de frutos de melão, e caracterizá-las quanto a capacidade de formação e manutenção da camada de biofilme. Leveduras foram isoladas a partir de tecidos epidérmicos do melão amarelo *Cucumis melo* L. e as espécies a que pertencem foram identificadas com base em biologia molecular, utilizando sequências da região ITS. Um total de 18 cepas foram isoladas. O gênero *Candida* agrupou o maior número de cepas, totalizando 9 isolados. Todas as leveduras avaliadas apresentaram formação de biofilme, em pelo menos um intervalo de avaliação. Ao final de 24 h, o maior valor de concentração de cristal violeta (CCV) foi de 0,067 mg mL<sup>-1</sup>. Os maiores valores de CCV e das camadas de biofilme foram observadas as 48 h e as 72 h. Os resultados apontados neste estudo, representam os primeiros relatos de *Candida orthopsilosis*, *Candida sorboxylosa*, *Hyphopichia burtonii*, *Kodameae ohmeri*, *Metschnikowia* sp., *Meyerozyma guilliermondii*, *Pseudozyma churashimaensis* e *Rhodotorula* sp. presentes naturalmente na microbiota de melão. O comportamento de formação de biofilme, demonstrados pelos isolados de *C. sorboxylosa* e *C. orthopsilosis* utilizados nesse trabalho, indicam que a eficiência de formação e manutenção de biofilme é relativa e particular a cada isolado. A microbiota do melão amarelo apresenta uma ampla diversidade a nível de gênero e espécie e essa diversidade de leveduras apresenta diferentes comportamentos na formação e manutenção de biofilme, podendo se comportar com alta, média e baixa eficiência.

**Palavras-chave:** Leveduras, biotecnologia, biofilme, melão amarelo

**ABSTRACT:**

Biofilms can be defined as a sessile community of microorganisms, encapsulated by a matrix of extracellular polymeric substances, formed and found in biotic and abiotic substrates. Bacteria, protozoa, yeasts or filamentous fungi have the ability to form biofilms and the characteristics of this formation vary according to the type of microorganism involved. This work addresses aspects related to the recognition of yeast species present in the melon fruit microbiota, and the ability to form and maintain the biofilm layer by these yeasts. Yeasts were isolated from epidermal tissues of yellow melon and identified at the species level, totaling 18 strains. The genus *Candida* grouped the largest number of strains, totaling 9 isolates. All evaluated yeasts showed biofilm formation, in at least one evaluation interval. At the end of 24 h, the highest crystal violet concentration (CCV) value was 0.067 mg mL<sup>-1</sup>. The highest values of CCV and biofilm layers were observed between 48 h and 72 h. The results pointed out in this study represent the first reports of *Candida orthopsilosis*, *Candida sorboxylosa*, *Hyphopichia burtonii*, *Kodameae ohmeri*, *Metschnikowia* sp, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pseudozyma churashimaensis* and *Rhodotorula* sp naturally present in the melon microbiota. The behavior of biofilm formation, demonstrated by the isolates of *C. sorboxylosa* and *C. orthopsilosis* used in this work, indicates that the efficiency of formation and maintenance of biofilm is relative and particular to each isolate. The yellow melon microbiota has a wide diversity in terms of genus and species and this diversity of yeasts presents different behaviors in the formation and maintenance of biofilms, and can behave with high, medium and low efficiency.

**Key-words:** Yeast, biotechnology, biofilm, yellow melon

**INTRODUÇÃO**

As leveduras são fungos unicelulares capazes de formar estruturas conhecidas por biofilmes (FEYDER *et al.*, 2015). Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade séssil de microrganismos, encapsulados por uma matriz de substâncias

poliméricas extracelulares (SPE), formados e encontrados em substratos bióticos e abióticos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Bactérias, protozoários, leveduras ou fungos filamentosos apresentam a capacidade de formação de biofilmes e as características dessa formação variam conforme o tipo de microrganismo envolvido (HARDING *et al.*, 2009). A formação do biofilme por leveduras ocorre em cinco etapas: 1) adesão de células a uma superfície, por meio de interações físico-químicas; 2) agrupamento de células em meio presença de uma matriz extracelular polimérica; 3) formação de camada basal de micro colônias, com o desenvolvimento de hifas e o aumento na matriz polimérica, induzindo o estabelecimento de agregados em multicamadas; 4) maturação celular sobre a superfície; 5) a maturação provoca a liberação de células que poderão dar início a uma nova formação de biofilme (BLANKENSHIP & MITCHELL 2006; SUN *et al.*, 2015).

Em ambiente natural, biofilmes microbianos podem ser encontrados em quase todos os tipos de substrato, desde que estes tenham um nível de umidade suficiente para tolerar o crescimento desses microrganismos. Vale ressaltar que em ambientes inóspitos, a capacidade para formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência fundamental que pode ser desempenhada por alguns tipos de microrganismos (SREY *et al.*, 2013).

A formação e expressão de biofilme está relacionada a efeitos benéficos ou maléficos, dependendo da natureza e espécie do microrganismo formador dessa biocamada. Os efeitos negativos estão relacionados principalmente a microrganismos contaminantes e/ou patogênicos, capazes de provocar a biocorrosão de equipamentos; contaminação de alimentos; e danos para a saúde humana, devido ao desenvolvimento de biofilmes no interior do organismo, provocando infecções em tecidos, trato urinário, rejeição de próteses, entre outros problemas, podendo evoluir a óbito (PIZZOLITTO *et al.*, 2001).

Diferentemente, os efeitos benéficos são desempenhados por microrganismos com importante aplicação em diversas atividades como a produção e degradação de matéria orgânica; tratamento de efluentes, por meio da remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas; em aplicações farmacêuticas, na produção de antibióticos; em processos biológicos na extração de metais a partir de minério; e em reatores nos processos fermentativos (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Biofilmes produzidos por leveduras são comumente encontrados em tecidos vegetais. A fixação de leveduras nesses tecidos é mediada por proteínas específicas

ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol, presentes na parede celular das leveduras (FINKEL & MITCHELL, 2011; PU *et al.*, 2014). Por competirem por espaço, nutrientes, e serem os principais organismos encontrados na superfície de folhas e frutos, as leveduras têm sido largamente estudadas como promissores agentes de biocontrole – BCA's de fitopatógenos em pré e pós-colheita (ARAÚJO *et al.*, 2015), atuando como uma barreira física antimicrobiana impedindo a penetração de agentes externos (PARSEK & FUQUA, 2004).

O estudo da formação de biofilmes, a partir de leveduras isoladas de vegetais, não só contribui com informações sobre o potencial de aplicabilidade dessas leveduras no controle de fitopatógenos, mas também como alternativa de substituição de revestimentos plásticos por filmes biodegradáveis (DAVANÇO *et al.*, 2007) sobre frutos e vegetais, por exemplo, bem como se apresenta como um indicador de cepas potenciais ao processo de produção industrial de álcool (FIDALGO, 2006).

Além dos tipos de efeitos envolvidos na ação microbiana, a capacidade de formação e manutenção de biofilme está relacionada diretamente ao gênero e/ou espécie de microrganismos envolvido. Por exemplo, espécies do gênero *Candida*, que é um competente produtor de biofilme, têm apresentado importante frequência de isolados, cerca de 80 %, nas infecções fúngicas registradas em ambientes hospitalares, além disso, se trata da quarta maior causa de infecção sanguínea, direcionando cerca de 38 % dos pacientes ao óbito (TAMURA *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre as espécies de leveduras presentes na microbiota de melão, bem como sua capacidade de formação e manutenção de biofilme, assim este trabalho aborda aspectos relacionados ao reconhecimento de espécies de leveduras presentes na microbiota de frutos de melão, e a capacidade de formação e manutenção da camada de biofilme por essas leveduras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção e seleção de leveduras**

As leveduras foram isoladas a partir dos tecidos do pericarpo de melão amarelo, adquiridos comercialmente no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA/PE) no município de Recife-PE em 2015 e, após processos de purificação e preservação em óleo mineral, armazenadas na Coleção de Fungos de Solo – CFS,

na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, localizada em Recife, estado de Pernambuco.

Os isolados foram recuperados da Coleção CFS-LAFSOL/UFRPE, cultivados em meio yeast extract peptone dextrose (YEPD-ágar, Sigma Aldrich, USA) e foram selecionados 18 isolados (LCFS 001, LCFS 002, LCFS 003, LCFS 006, LCFS 007, LCFS, 008, LCFS 011, LCFS 012, LCFS 014, LCFS 016, LCFS 019, LCFS 022, LCFS 029, LCFS 030, LCFS 031, LCFS 033, LCFS 034 e LCFS 044), considerando-se as diferenças morfológicas de crescimento e desenvolvimento das colônias em YEPD-ágar.

### **Identificação das leveduras**

As leveduras foram cultivadas por cinco dias em meio YEPD ágar e uma porção de crescimento das colônias foram removidas e transferidas para um microtubo de polipropileno estéril (Axygen® capacidade 2 mL) contendo 600 µl de tampão de extração para a extração de DNA genômico. O DNA foi extraído usando o protocolo CTAB (brometo de cetil trimetilamônio) descrito por Murray e Thompson (1980), com modificações. As amostras de DNA obtidas foram aferidas em espectrofotômetro NanoPhotometer UV/Vis (IMPLEN, Korea) e diluídas para 25 ng µL<sup>-1</sup>.

Sequências de DNA dos espaços internos transcritos (ITS) 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA (ITS) foram amplificadas por PCR em reações de 25 µL contendo: 1 µl de DNA tamplate (50 ng µl<sup>-1</sup>), 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2 µl 10X PCR Buffer; 1,8 µl magnesium chloride 50 mM; 2 µl nucleotídeo mix (Thermo Scientific, Waltham, USA); 1,8 µl de cada primer forward e reverse, a 10 µM (sintetizados por Invitrogen™, Carlsbad, USA), 1 µl de dimethyl sulfoxide - DMSO (Synth, São Paulo, BR) e 13,5 µl de água ultrapura. As ciclagens foram realizadas em termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems) e os fragmentos de DNA foram amplificados com desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; seguidas de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min., 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação PureLink™ PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, e sequenciados em sequenciador automático ABI3500, na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil). Os cromatogramas foram ajustados



em contigs, editados e as sequências consenso comparadas inicialmente com as sequências referências das espécies de leveduras recuperadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para verificar quais as possíveis espécies compatíveis. As múltiplas sequências de ITS foram alinhadas no portal MAFFT versão 7 e a filogenia foi inferida comparando-se os agrupamentos filogenéticos por Análise de Máxima Verossimilhança - MV aproximada no portal CIPRES (<https://www.phylo.org>).

As análises de MV foram estimadas com a ferramenta RAXML-HPC2 on XSEDE, modelo GTR GAMMA, e a melhor topologia de árvore atrelada aos valores de Bootstrap em 1000 pseudoreplicatas. As árvores foram visualizadas utilizando a ferramenta FigTree Versão 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) com base nos resultados comparativos das filogenias obtidas por MV de ITS para o reconhecimento das espécies (Tabela 1)

**Tabela 1.** Detalhamento informativo dos gêneros e espécies de leveduras incluídas nas análises filogenéticas deste estudo

<b>Táxon<sup>a</sup></b>	<b>N. isolado<sup>b</sup></b>	<b>Região ITS<sup>c</sup> N. acesso NCBI</b>
<i>Candida albicans</i> *	CBS 562 <sup>T</sup>	NR_125332
<i>Candida caryicola</i> *	CBS 8847 <sup>T</sup>	NR_077194
<i>Candida danieliae</i>	CBS 8533 <sup>T</sup>	HM156530
<i>Candisa dubliniensis</i>	CBS 7987 <sup>T</sup>	NR_119386
<i>Candida hainanensis</i>	AS2.3478	EU284099
<i>Candida leandrae</i>	CBS 9735 <sup>T</sup>	NR_155222
<i>Candida loeiensis</i>	CBS 11899	NR_155223
<i>Candida metapsilosis</i>	CBS 10907 <sup>T</sup>	NR_165186
	ATCC 96139 <sup>T</sup>	NR_130661
<i>Candida orthopsilosis</i>	<b>CFS 014</b>	ND
	<b>CFS 031</b>	ND
	CBS 604 <sup>T</sup>	AJ635316
<i>Candida parapsilosis</i>	<b>CFS 007</b>	ND
	<b>CFS 012</b>	ND
<i>Candida restiingae</i>	CBS 8493 <sup>T</sup>	NR_155225
	JYC536	MN244378
	<b>CFS 022</b>	ND
<i>Candida sorboxylosa</i>	<b>CFS 029</b>	ND
	<b>CFS 030</b>	ND
	<b>CFS 034</b>	ND
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94 <sup>T</sup>	NR_111250
	CBS 2352 <sup>T</sup>	GU246247
<i>Hyphopichia burtonii</i>	<b>CFS 001</b>	ND
<i>Hyphopichia fennica</i>	CBS 5928 <sup>T</sup>	NR_111246
<i>Hyphopichia gotoi</i>	CBS 8531 <sup>T</sup>	NR_137743

<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>	CBS 2455 <sup>T</sup>	NR_138220
<i>Kodamaea anthophila</i>	CBS 8494 <sup>T</sup>	NR_155239
<i>Kodamaea kakaduensis</i>	CBS 8611 <sup>T</sup>	NR_155240
<i>Kodamaea nitidularum</i>	CBS 8491 <sup>T</sup>	NR_155241
	CBS 5367 <sup>T</sup>	NR_121464
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<b>CFS 008</b>	ND
	<b>CFS 044</b>	ND
<i>Kodamaea transpacific</i>	CBS 12823	KF002564
<i>Meyerozyma amylolytica</i>	DSM 27310 <sup>T</sup>	KY673531
<i>Meyerozyma athensensis</i>	CBS 9840 <sup>T</sup>	AY553846
<i>Meyerozyma caribbica</i>	CBS 9966 <sup>T</sup>	NR_149348
<i>Meyerozyma carpophila</i>	CBS 5256 <sup>T</sup>	AF022719
<i>Meyerozyma elateridarum</i>	CBS 9842 <sup>T</sup>	NR_111350
	CBS 2030 <sup>T</sup>	MW284473
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> *	<b>CFS 011</b>	ND
	<b>CFS 019</b>	ND
<i>Meyerozyma neustonensis</i> *	CBS 11061 <sup>T</sup>	EF621563
<i>Meyerozyma smithsonii</i>	CBS 9839 <sup>T</sup>	AY553844
<i>Metschnikowia lophuriensis</i>	DMKU-RK277	AB697761
<i>Metschnikowia agaves</i>	CBS 7744 <sup>T</sup>	NR_119735
<i>Metschnikowia caudata</i> *	CBS 13651	KM233175
<i>Metschnikowia drosophilae</i>	CBS 8809 <sup>T</sup>	EU343805
<i>Metschnikowia laotica</i>	CBS 1296 <sup>T</sup>	NR_164084
<i>Metschnikowia torresii</i>	CBS 5152	KY102446
	<b>CFS 006</b>	ND
<i>Metschnikowia sp.</i>	<b>CFS 003</b>	ND
	OK96	AB548947
<i>Pseudozyma churashimaensis</i>	<b>CFS 016</b>	ND
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	CBS 10454	EF079966
<i>Pseudozyma prolifica</i>	CBS 319.87 <sup>T</sup>	AF294700
<i>Pseudozyma thailandica</i>	CBS 10006 <sup>T</sup>	NR_155686
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	JCM 10324 <sup>T</sup>	AB089372
<i>Rhodotorula araucariae</i>	CBS 6031 <sup>T</sup>	NR_073277
<i>Rhodotorula babjevae</i>	CBS 7808 <sup>T</sup>	NR_077096
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	CBS 4406	KY104735
<i>Rhodotorula diobovata</i>	CBS 6085 <sup>T</sup>	NR_073271
<i>Rhodotorula evergladiensis</i>	CBS 10880 <sup>T</sup>	FJ008054
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 4406 <sup>T</sup>	AF444501
<i>Rhodotorula graminis</i>	CBS 2826 <sup>T</sup>	NR_073273
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	CBS 7463 <sup>T</sup>	NR_073282
<i>Rhodotorula mucilaginos</i>	CBS 316 <sup>T</sup>	NR_073296
<i>Rhodotorula pacifica</i>	SY-96	AB026006
<i>Rhodotorula paludigena</i> *	CBS 6567	AF444493
<i>Rhodotorula sinensis</i>	AS2.1389	KJ778637
<i>Rhodotorula sp.</i>	<b>CFS 002</b>	ND
<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	CBS 5939	AF444499

<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	BCRC 23118	GU646862
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 349	AF444489

<sup>†</sup>Cultura *ex-type*;

\*Isolados utilizados como *outgroup*;

<sup>b</sup>Isolados com número em negrito foram obtidos nesse estudo a partir de isolamentos dos tecidos de melão amarelo (*Cucumis melo*).

<sup>c</sup>ITS: Espaço de Transcrição Interna (ITS1-5.8S-ITS2);

<sup>ND</sup>Sequências serão depositadas no banco de dados do NCBI;

ATCC – Department of Food Sciences and Nutrition, Laval University, Canadá;

BCRC – Projeto NCBI RefSeq Targeted Loci

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda;

CFS – Coleção Fungos de Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

## Preparo de curva padrão

A curva de calibração padrão utilizada para a determinação de formação de biofilme foi preparada a partir de uma solução estoque aquosa de cristal de violeta (CV) a 0,4% (Dinâmica Indústria Brasileira). A solução estoque de CV foi diluída onze vezes, pelo fator de diluição 0,5 para a obtenção de doze soluções denominadas de pontos de leitura, nas seguintes concentrações (mg mL<sup>-1</sup>): 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313; 0,0156; 0,0078; 0,0039 e 0,00195.

Para cada ponto de leitura, 100 µL de solução foi transferido para um poço da placa de microtitulação com 96 poços do tipo fundo chato e estéreis (Olen<sup>®</sup> referência K30-5096P). As placas foram submetidas a leitura de absorbância em leitor de microplacas tipo Elisa (Biotek<sup>®</sup>, Winooski, VT, USA) em filtro de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos foram correlacionados aos seus respectivos pontos de leitura e a relação entre absorbância e concentração de cristal violeta (mg mL<sup>-1</sup>) foi determinada pela equação linear (Figura 1):  $CV = (0,0366A) - 0,0004$ ; sendo **CV** = concentração de cristal violeta e **A** = absorbância.

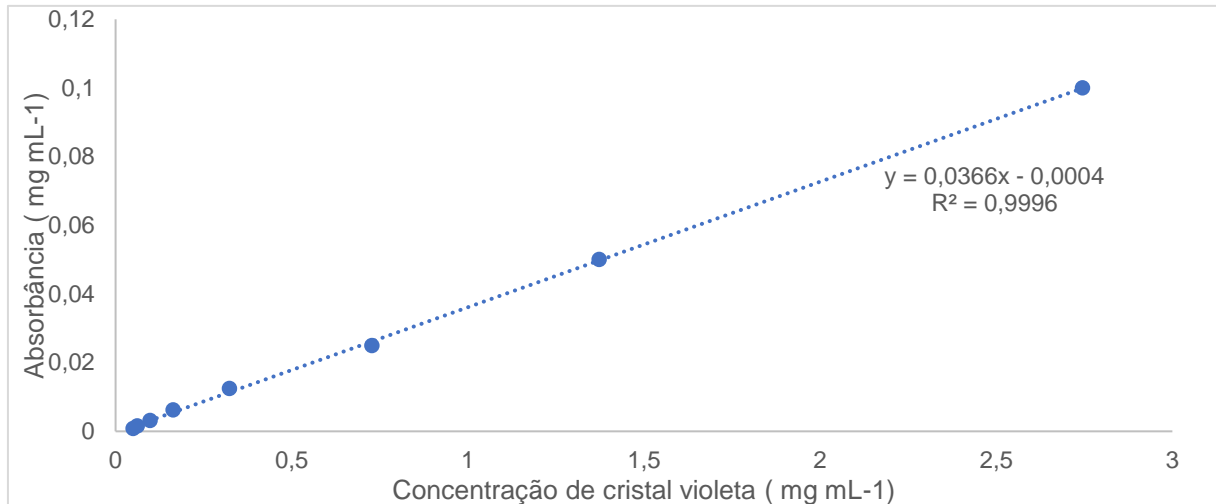


Figura 1. Determinação da equação linear a partir da relação entre os valores de absorvância e concentração de cristal violeta.

### Preparo de células e formação de biofilme

As leveduras foram cultivadas por 48 h em meio YEPD-ágar. Com auxílio de uma alça de repique, porções das colônias foram transferidas para um tubo de polipropileno para centrifugação (KASVI®, capacidade 50 mL) contendo meio de cultura YEPD líquido estéril, sendo a concentração de células ajustada para  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

A suspensão de células foi transferida, em alíquotas de 100 µl, para o poço da placa de microtitulação, com 96 poços do tipo fundo curvo (fundo “U”) e estéreis (Olen® ref.: K30-5096U). Para promover a adesão das células de leveduras à parede dos poços, as placas foram incubadas por três horas, a  $28 \pm 2$  °C em agitação constante a 75 rpm mesa agitadora horizontal (Nova Ética MOD. 109-2). No tratamento controle, a suspensão de células em meio YEPD foi substituída por meio YEPD estéril.

Após a incubação, o meio de cultivo dos poços foi descartado e cada um dos poços foi lavado com 200 µl de phosphate bufferid-saline (PBS), por duas vezes. Adicionou-se aos poços 100 µl de meio de cultivo YEPD estéril e as placas foram incubadas, nas mesmas condições citadas acima, durante o intervalo pré-estabelecido para a avaliação da formação e manutenção da camada de biofilme. Cada levedura representou um tratamento, totalizando 19 tratamentos (18 leveduras + controle) avaliados em três períodos de incubação: 24 h, 48 h e 72 h e o experimento foi realizado em quadruplicata. Nos tratamentos incubados por 48 e 72 h, os meios

presentes nos poços foram submetidos a sucção total e reabastecimento com 100 µl de meio de cultivo YEPD estéril, a cada 24 h.

### **Determinação de biofilme**

As placas foram retiradas da incubação, os meios dos poços foram descartados e cada poço foi lavado duas vezes com PBS, como descrito no preparo de células. Após a completa remoção do PBS, foram adicionados aos poços 100 µL de solução aquosa de cristal de violeta a 0,4%, para corar as células das leveduras, e a placa foi mantida em repouso durante 45 min. A solução de cristal violeta foi removida e os poços foram lavados três vezes, com adições e remoções sucessivas de 200 µl de água destilada estéril.

As placas foram mantidas em posição invertida sobre papel toalha absorvente estéril durante 15 min e as células de leveduras foram descoradas com adição de 200 µl de Etanol a 95%, por 45 min. Parte da solução alcóolica de cristal violeta obtida foi transferida para uma nova placa de microtitulação com 96 poços do tipo fundo chato (100 µl em cada poço), com disposição das amostras equivalentes a placa inicial, e adicionou-se 100 µl de água destilada estéril, totalizando 200 µl de solução em cada poço. Todos os procedimentos realizados nas amostras de leveduras foram realizados ao tratamento controle.

As placas foram submetidas a leitura de absorbância em (Biotek®, Winooski, VT, USA) em filtro de 595 nm (Avaliado pelo Software Gen5®) da mesma forma como performado para a curva de calibração. Os valores de absorbância obtidos nas amostras foram transformados em valores de concentração de cristal violeta removidos das células de leveduras, utilizando a equação ( $y=0,0366x - 0,0004$ ) da curva de calibração.

As leveduras foram classificadas, para cada intervalo de avaliação, quanto a eficiências na produção de biofilme (ePB), de acordo com a quantidade de cristal violeta ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) obtido nos processos de descoramento das células de leveduras, em alta eficiência (PBhi), média eficiência (PBme) ou baixa eficiência (PBlo), nos quais:  $\text{PBhi} \geq 0,04$ ;  $0,04 > \text{PBme} \geq 0,02$  e  $\text{PBlo} < 0,02$ .

### **Delineamento experimental e análises estatísticas**

As amostras foram distribuídas nas placas em quadruplicatas e os tratamentos delineados em blocos inteiramente casualizados – BIC. As médias de concentração de cristal violeta (CCV) foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e para as análises significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste Scott knott a 5 % de probabilidade, utilizando software Sisvar v5.6 (Ferreira, 2011).

## RESULTADOS

### Identificação das leveduras

O reconhecimento específico de todos os isolados utilizados nesse trabalho foi realizado por meio de inferências filogenéticas baseadas nos agrupamentos dos isolados utilizados e representantes das espécies relacionadas, obtidos por meio de análises de máxima verossimilhança – MV. Em um subclado formado pelos representantes das espécies *M. caribbica*, *M. guilliermondii* e *M. carpophila*, dois isolados (CFS 011 e CFS 019) foram reconhecidos como *Meyerozyma guilliermondii* (Fig. 2). Relacionados ao gênero *Metschnikowia*, em um clado composto pelas espécies *M. torresii*, *M. laotica*, *M. agaves*, *M. drosophilae* e *C. danieliae*, os isolados CFS 003 e CFS 006 apresentaram distanciamento filogenético das demais espécies e, por isso, não foi possível determinar sua classificação a nível específico, utilizando a região gênica ITS, sendo esses isolados denominados de *Metschnikowia* sp.1 (Fig. 3).

Quatro isolados (CFS 007, CFS 012, CFS 014 e CFS 031) foram agrupados em um clado com representantes de *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* e *Candida parapsilosis*. Dois deles (CFS 014 e CFS 031) foram reconhecidos como *Candida orthopsilosis* e os demais (CFS 007 e CFS 012) foram reconhecidos como pertencentes a espécie *Candida parapsilosis* (Fig. 4). Relacionado com o gênero *Rhodotorula*, CFS 002 foi agrupado em um clado com representantes de *Rhodotorula toluroides* e *Rhodotorula sinensis*, mas por não apresentar distinção entre as espécies citadas, não foi possível determinar sua classificação a nível específico, sendo denominados de *Rhodotorula toluroides/sinensis* (Fig. 5).

No reconhecimento das espécies pertencentes ao gênero *Pseudozyma* e de *Candida sorboxylosa* o isolado CFS 016 foi agrupado em um clado com o isolado

representante de *Pseudozyma churashimaensis* e os quatro isolados (CFS 022, CFS 029, CFS 030 e CFS 034) agrupados com o representante de *Candida sorboxylosa*. (Fig. 6). No reconhecimento das espécies pertencentes ao gênero *Kodamaea* e *Hyphopichia*, por sua vez, o isolado CFS 001 foi agrupado em um clado com o isolado representante de *Hyphopichia burtonii* e os dois isolados (CFS 044 e CFS 008) agrupados com o representante de *Kodamaea ohmeri*, suportados por valores de bootstrap acima de 70 (Fig. 7).

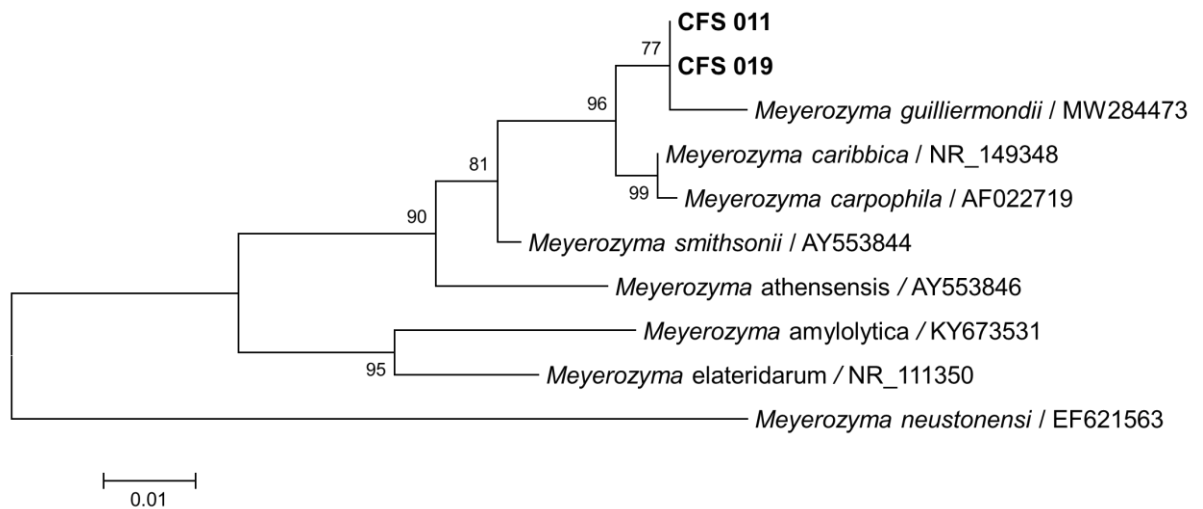


Figura 2. Relações filogenéticas entre espécies de *Meyerozyma*, por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu dez *táxons*, totalizando 502 caracteres, sendo: 414 conservados, 31 parcimoniosamente informativos e 88 variáveis. O código de acesso do GenBank está grafado após os nomes dos *táxons*. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, baseados em 1000 réplicas de bootstrap. *Meyerozyma neustonensi* foi utilizada como espécie *outgroup*. *Táxons* em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

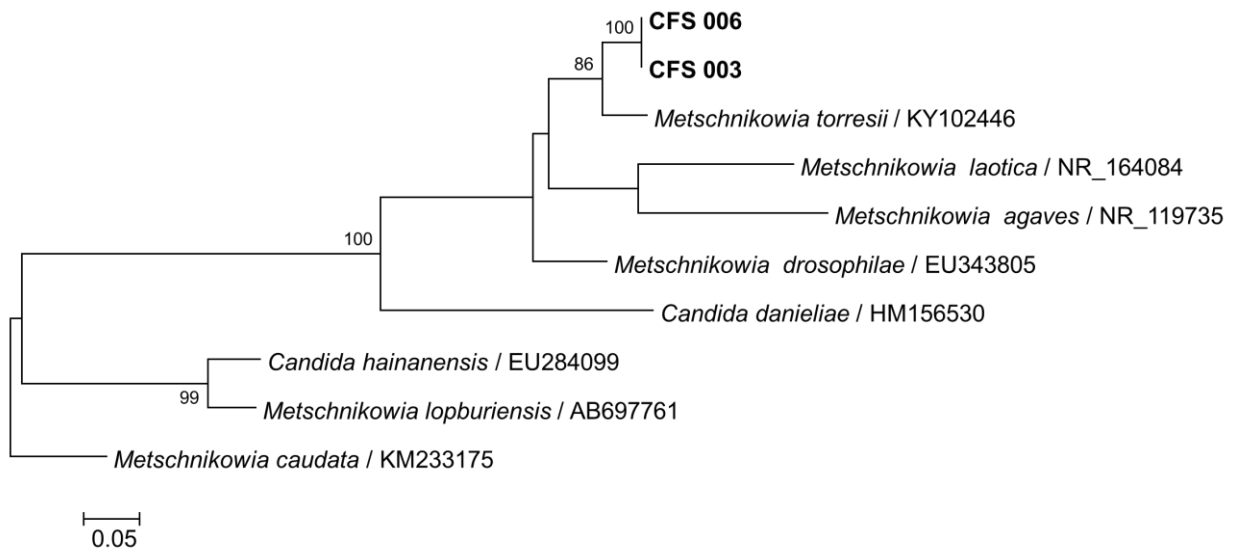


Figura 3. Relações filogenéticas entre espécies de *Metschnikowia* por meio de análise de Máxima verossimilhança-MV das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu dez *táxons*, totalizando 465 caracteres, sendo: 196 conservados, 127 parcimoniosamente informativos e 208 variáveis. Números de acesso do GenBank estão grafados após os nomes dos *táxons*. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, baseados em 1000 réplicas de bootstrap. *Metschnikowia caudata* foi utilizada como espécie *outgroup*. *Taxons* em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

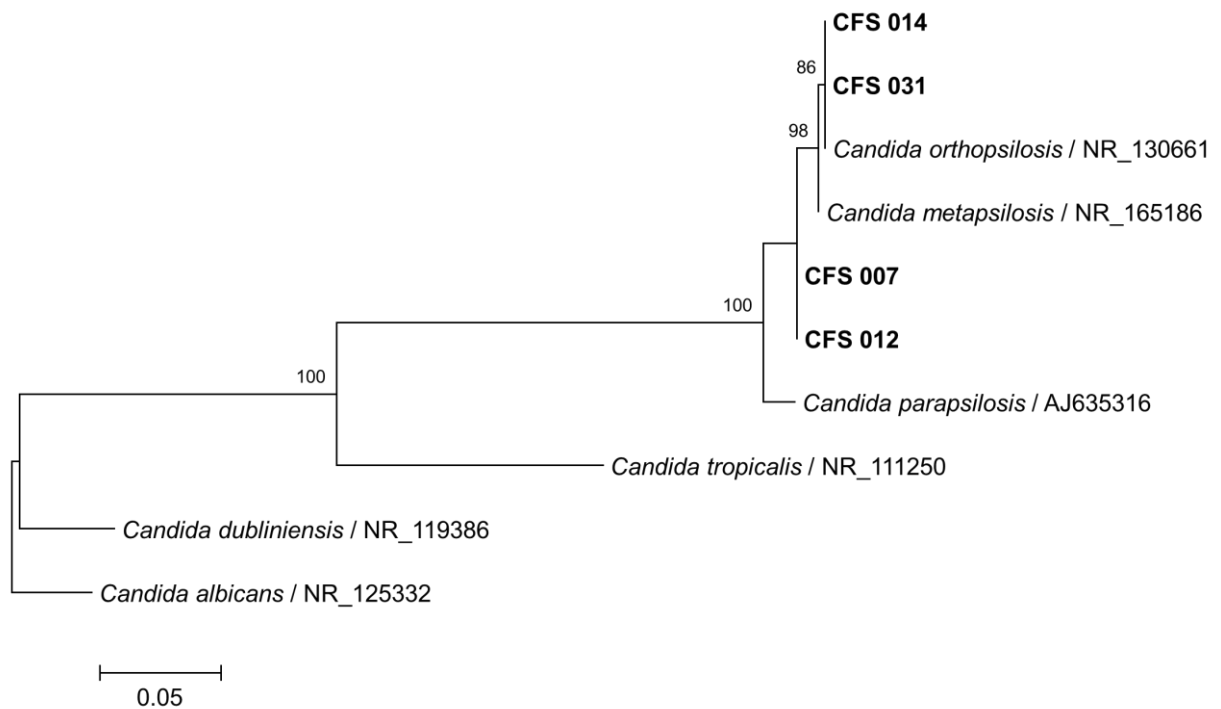


Figura 4. Relações filogenéticas entre espécies de *Candida* por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu dez *táxons*, totalizando 465 caracteres,



sendo: 287 conservados, 75 parcimoniosamente informativos e 170 variáveis. Números de acesso do GenBank estão grafados após os nomes dos táxons. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, com base em 1000 réplicas de bootstrap *Candida albicans* foi utilizada como espécie *outgroup*. Táxons em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

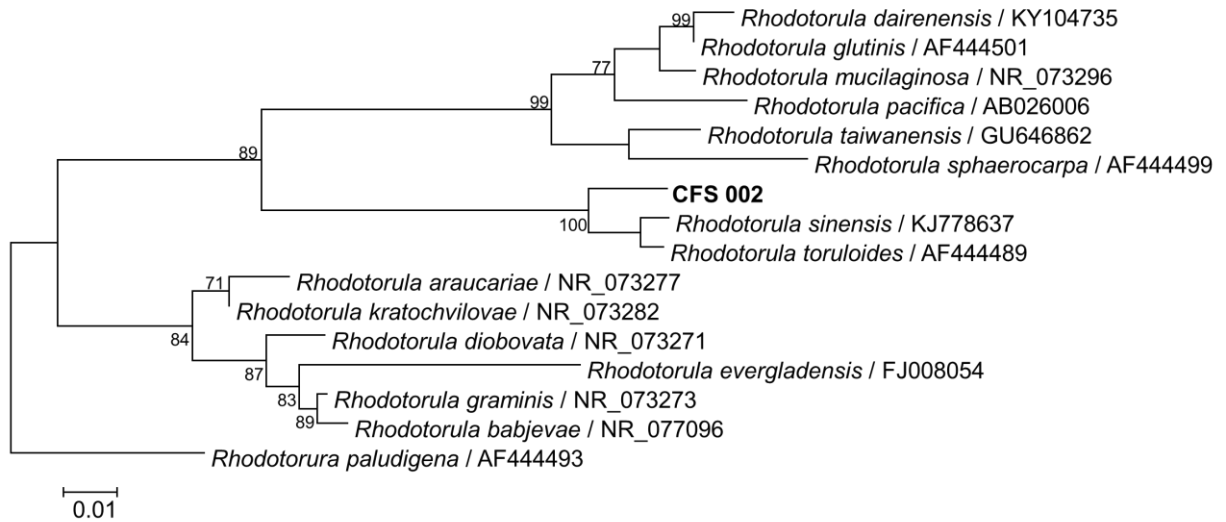


Figura 5. Relações filogenéticas entre espécies de *Rhodotorula* por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu dezesseis *táxons*, totalizando 655 caracteres, sendo: 499 conservados, 88 parcimoniosamente informativos e 134 variáveis. Números de acesso do GenBank estão grafados após os nomes dos táxons. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, com base em 1000 réplicas de bootstrap *Candida carycola* foi utilizada como espécie *outgroup*. Taxons em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

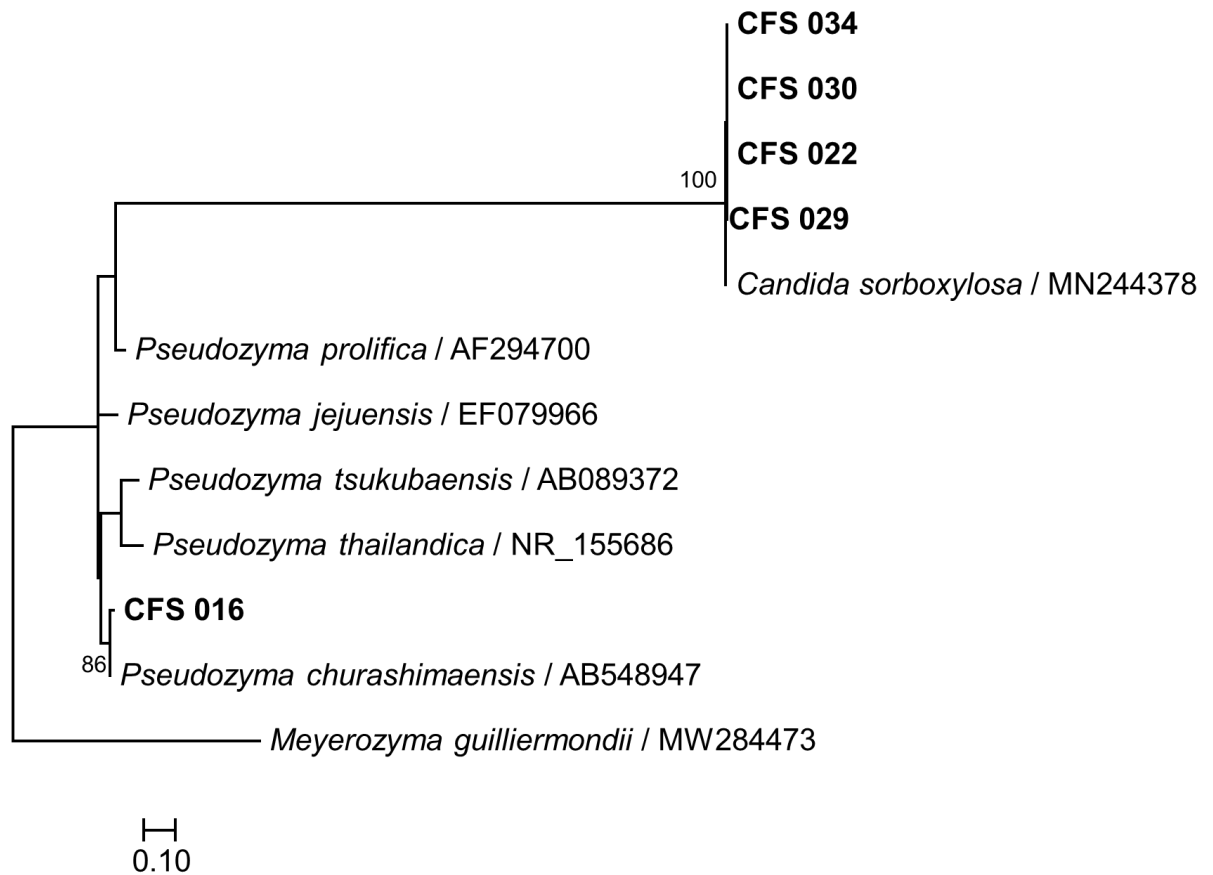


Figura 6. Relações filogenéticas entre a espécie *Candida sorboxylosa* e espécies de *Pseudozyma*, por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu doze *táxons*, totalizando 499 caracteres, sendo: 208 conservados, 147 parcimoniosamente informativos e 270 variáveis. Números de acesso do GenBank estão grafados após os nomes dos táxons. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, com base em 1000 réplicas de bootstrap. *Meyerozyma guilliermondii* foi utilizada como espécie *outgroup*. Taxons em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

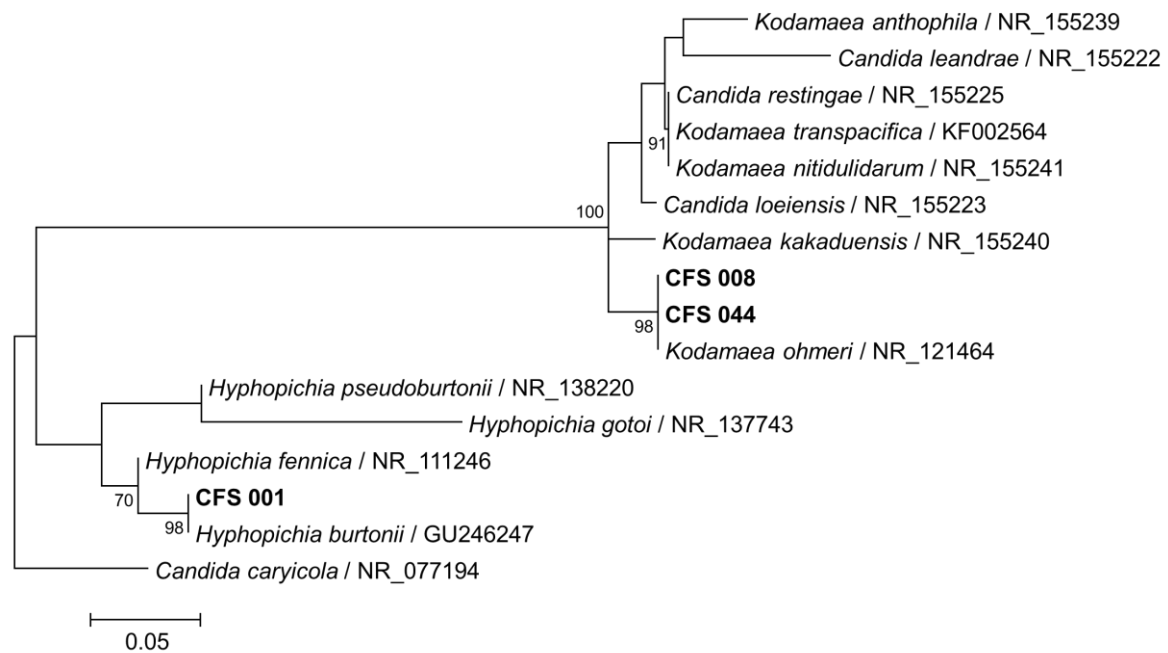


Figura 7. Relações filogenéticas entre a espécie pertencentes aos gêneros *Kodamaea* e *Hyphopichia*, por meio de análise de Máxima verossimilhança das sequências do gene ITS. O *dataset* das sequências alinhadas abrangeu doze *táxons*, totalizando 487 caracteres, sendo: 249 conservados, 140 parcimoniosamente informativos e 215 variáveis. Números de acesso do GenBank estão grafados após os nomes dos *táxons*. Valores acima de 70% são grafados nos ramos, com base em 1000 réplicas de bootstrap. *Candida caryicola* foi utilizada como espécie *outgroup*. *Taxons* em negrito representam os isolados utilizados neste estudo.

## Formação, manutenção e eficiência de biofilme

Todas as leveduras avaliadas apresentaram formação de biofilme, em pelo menos um intervalo de avaliação. Ao final de 24 h, o maior valor de concentração de cristal violeta (CCV) foi de 0,067 mg mL<sup>-1</sup>. Os maiores valores de CCV, e consequentemente das camadas de biofilme, foram observados as 48 h. As 72 h os valores de CCV foram muito baixos e indetectáveis em alguns casos (Tab. 2).

**Tabela 2.** Concentração média de cristal violeta – CCV (mg mL<sup>-1</sup>) descorados de células de leveduras, componentes de camadas de biofilme, mantidas por 24, 48 e 72 h de incubação. Classificação de leveduras quanto a eficiência de manutenção das camadas de biofilme – ePB.

Espécies	<sup>1</sup> Código CFS	24 h		48 h		72 h	
		<sup>2</sup> CCV	<sup>3</sup> ePB	CCV	ePB	CCV	ePB
<i>Candida orthopsilosis</i>	LCFS 007	0,015 E	PBlo	0,030 D	PBme	0,010 C	PBlo
	<b>LCFS 012</b>	0,052 B	PBhi	0,085 A	PBhi	0,030 B	PBme
	<b>LCFS 014</b>	0,030 D	PBme	0,075 A	PBhi	0,027 B	PBme
	<b>LCFS 031</b>	0,065 A	PBhi	0,080 A	PBhi	0,042 A	PBhi
<i>Candida sorboxylosa</i>	LCFS 022	0,040 C	PBhi	0,022 E	PBme	0,000 D	PBlo

	LCFS 029	0,032 D	PBme	0,040 C	PBhi	0,005 C	PBlo
	LCFS 030	0,022 E	PBme	0,015 E	PBlo	0,007 C	PBlo
	LCFS 033	0,067 A	PBhi	0,032 D	PBme	0,010 C	PBlo
	LCFS 034	0,012 E	PBlo	0,007 E	PBlo	0,010 C	PBlo
<i>Hyphopichia burtonii</i>	LCFS 001	0,012 E	PBlo	0,012 E	PBlo	0,000 D	PBlo
<i>Kodamaea ohmeri</i>	LCFS 008	0,015 E	PBlo	0,032 D	PBme	0,007 C	PBlo
	LCFS 044	0,032 D	PBme	0,032 D	PBme	0,010 B	PBlo
<i>Metschnikowia sp</i>	LCFS 003	0,057 A	PBhi	0,047 B	PBhi	0,005 C	PBlo
	LCFS 006	0,042 C	PBhi	0,037 C	PBme	0,002 D	PBlo
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	LCFS 011	0,040 C	PBhi	0,040 C	PBhi	0,010 C	PBlo
	LCFS 019	0,067 A	PBhi	0,035 D	PBme	0,010 C	PBlo
<i>Pseudozyma churashimaensis</i>	LCFS 016	0,015 E	PBlo	0,027 D	PBme	0,000 D	PBlo
<i>Rhodotorula sp</i>	LCFS 002	0,042 C	PBhi	0,045 B	PBhi	0,000 D	PBlo
	CV	18,94		20,40		47,30	
	MG	0,037		0,039		0,010	

<sup>1</sup> Isolados destacados em negrito representam leveduras selecionadas por apresentarem manutenção satisfatória de biofilme durante o intervalo avaliado;

<sup>2</sup> Valores médios de concentração de cristal violeta – CVV descorados de células de leveduras. Nas colunas, diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,01$ ) pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, em DIC;

<sup>3</sup> Classificação quanto a eficiência de manutenção de biofilme – ePB: alta eficiência (PBhi), média eficiência (PBme) ou baixa eficiência (PBlo).

Na transição de 24 para 48 horas, observou-se que 27,78% das cepas mantiveram-se no perfil PBhi, 11,1% dos isolados exibiram um aumento de eficiência ao sair do perfil PBme para PBhi e/ou 16,67% dos indivíduos migraram do perfil PBlo para PBme. Observou-se também queda na eficiência nos 22,22% dos isolados que transitaram do perfil PBhi para PBme e em 5,56% que tiveram PBmédio para PBlo. A manutenção de eficiência no intervalo 24-48 h foi observado em 5,56 % e 11,11 % dos isolados, que mantiveram perfis de PBme e PBlo, respectivamente.

Diferentemente, na transição de 48 para 72 h, não houve incremento na eficiência de manutenção das camadas de biofilmes, ou seja, nenhum dos isolados foi capaz de ampliar essa eficiência. Contrariamente, aproximadamente 78% dos isolados apresentaram redução dessa eficiência: com 44,44% de PBme para PBlo, 11,11% passaram de PBhi para PBme e 22,22% de PBhi para PBlo. Os demais 5,56% e 16,67%, mantiveram eficiência constante de PBhi e PBlo, respectivamente (Fig. 7).

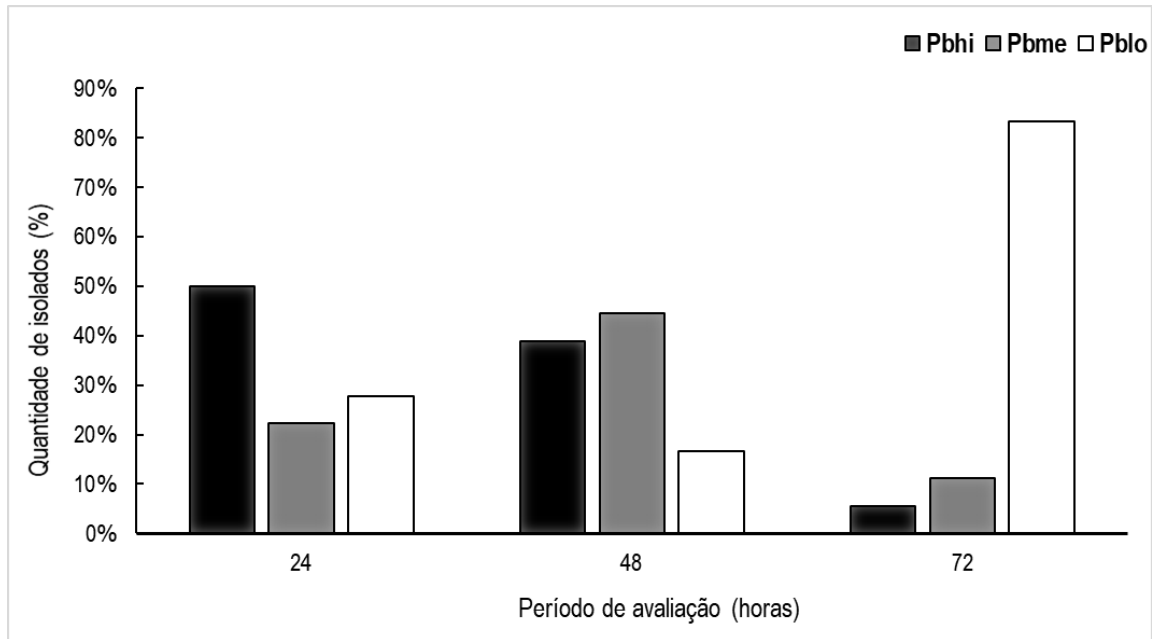
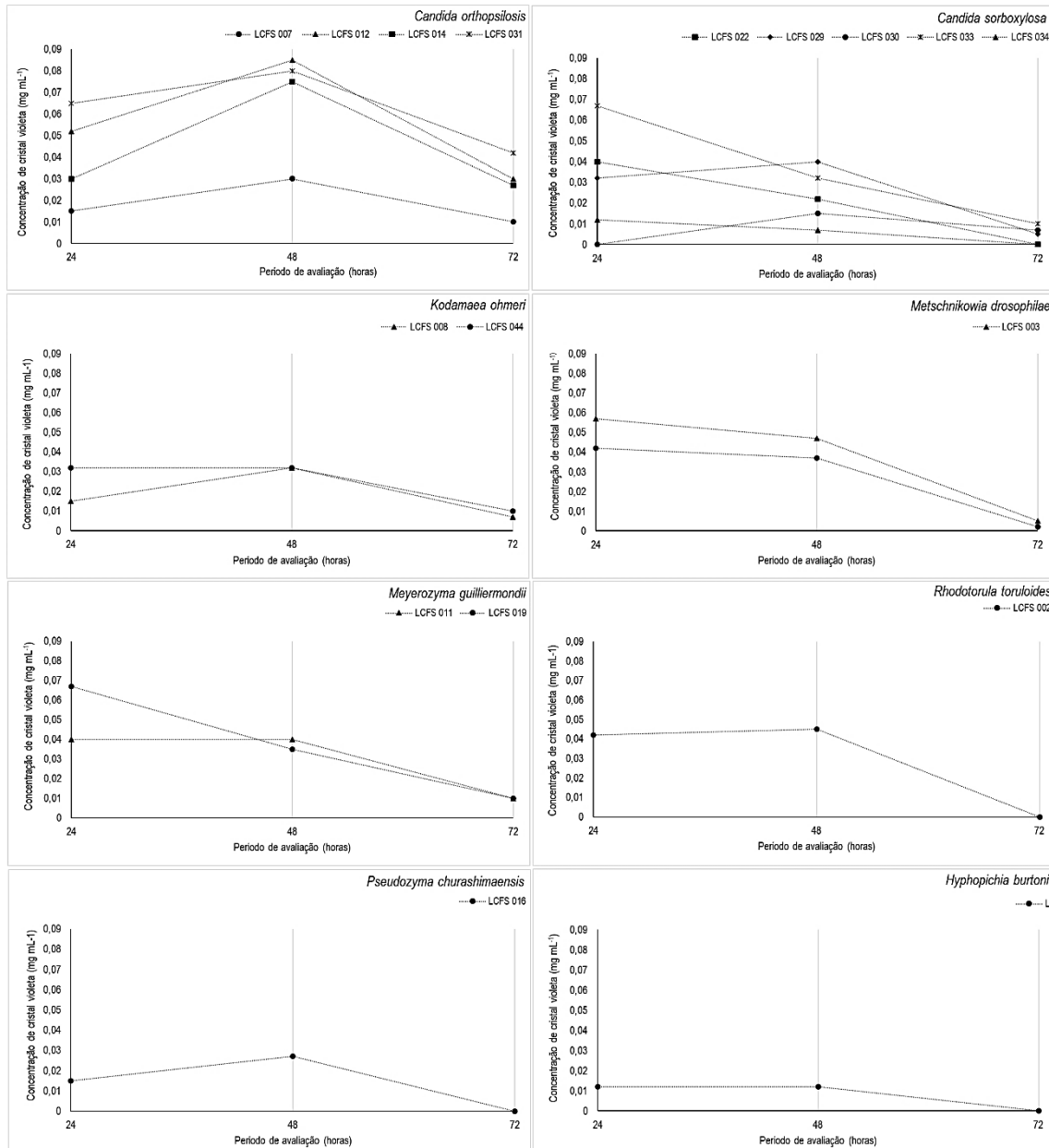


Figura 8. Frequência de isolados em relação a eficiência de produção e manutenção de camadas de biofilme durante 24, 48 e 72 h de incubação in vitro. Nota: Classificação quanto a eficiência de manutenção de biofilme – ePB: alta eficiência (PBhi), média eficiência (PBme) ou baixa eficiência (Pblo).

O comportamento diferiu não apenas entre as espécies estudadas, mas também quando comparados os isolados pertencentes a uma mesma espécie. Todas as leveduras de *Candida orthopsilosis* apresentaram comportamento ascendente quanto a manutenção da camada de biofilme, com posterior declínio até as 72 h, com destaque ao isolado LCFS 031 que foi classificado com PBhi nos 3 períodos de avaliação e LCFS 012 e LCFS 014, que apresentaram PBhi até as 48 h e apesar da redução para PBme às 72 h, mantiveram de forma satisfatória as camadas de biofilme, quando comparados aos isolados das outras espécies (Fig. 8).



**Figura 9.** Efeito do tempo na manutenção das camadas de biofilmes produzidas por leveduras. Isolados de *Candida orthopsilosis*, *Candida sorboxylosa*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia sp.*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodotorula toruloides*, *Pseudozyma churashimaensis* e *Hyphopichia burtonii* avaliados quanto a concentração de cristal violeta (mg mL<sup>-1</sup>) descorados das células presentes na camada de biofilme, no intervalo de 24 a 72 horas.

## DISCUSSÃO

Os resultados apontados neste estudo, representam os primeiros relatos de *C. orthopsilosis*, *C. sorboxylosa*, *H. burtonii*, *K. ohmeri*, *Metschnikowia sp.*, *M. guilliermondii*, *P. churashimaensis* e *Rhodotorula sp.* presentes naturalmente na microbiota de melão. As espécies identificadas nesse estudo também são relatadas em outros estudos em diferentes tecidos vegetais e subprodutos de origem vegetal

(Tab. 3). O gênero *Candida* é frequentemente relacionado a patologias em casos clínicos e as outras espécies de leveduras identificadas nesse estudo, podem apresentar diferentes relações acerca de aspectos patológicos e respostas de resistência a fármacos (Tab. 4).

Tabela 3. Relatos de espécies de leveduras em diferentes frutos, tecidos vegetais e subprodutos de origem vegetal

<sup>a</sup> Espécies identificadas	<sup>b</sup> Hospedeiros relatados	Referências
<i>Candida orthopsilosis</i>	<sup>1</sup> Pera, citrino e <sup>2</sup> tomate	<sup>1</sup> Hisiu-Jung et al. (2017); <sup>2</sup> Robl et al. (2014); <sup>3</sup> Granter et al. (2017)
<i>Candida sorboxylosa</i>	<sup>1</sup> Tomate, carambola, ameixa e <sup>3</sup> cactos	<sup>4</sup> Abe et al. (2015); <sup>5</sup> Gizaw et al. (2017); <sup>6</sup> Kanpiengiai et al. (2016)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	<sup>4</sup> Milho, <sup>5</sup> resíduos de café, <sup>6</sup> <i>Camellia sinensis</i> var, <sup>7</sup> cascas de maçã	<sup>7</sup> Wei et al. (2017); <sup>8</sup> Sharma et al. (2018); <sup>9</sup> Corbu et al. (2019)
<i>Kodameae ohmeri</i>	<sup>8</sup> Flores de <i>Lagenaria sicraria</i> , <sup>9</sup> rosa do damasco, <sup>10</sup> kiwi, <sup>11</sup> citrus, <sup>12</sup> mamão, cacau, manga e rambutão	<sup>10</sup> Niu et al. (2016); <sup>11</sup> Abdel-Sater et al. (2020); <sup>12</sup> Jacques et al. (2019)
<i>Metschnikowia</i> sp	Sem relatos	<sup>13</sup> Graça et al. (2015); <sup>14</sup> Kesmen et al. (2018); <sup>15</sup> Moubasher et al. (2018)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<sup>13</sup> Maçã, <sup>10</sup> kiwi, <sup>14</sup> cereja, <sup>15</sup> flores de manga, goiaba, romã, limão, eucalipto e de petúnia, <sup>16</sup> pepino nukazuke (pickles)	<sup>16</sup> Hirai et al. (2020); <sup>17</sup> Lee et al. (2017); <sup>18</sup> Khunnamwong et al. (2018)
<i>Pseudozyma churashimaensis</i>	<sup>17</sup> Folhas de pimenta e <sup>18</sup> tecidos de arroz, milho e cana-de-açúcar	<sup>19</sup> Coradetti et al. (2018); <sup>20</sup> Saran et al. (2017)

*Rhodotorula* sp. <sup>18</sup> Tecidos de milho, arroz e cana-de-açúcar, <sup>19</sup> em gramíneas e em <sup>20</sup> cascas em estágios de decomposição de banana, manga, lichia, melão e de ameixa

<sup>a</sup> Espécies presentes na microbiota do melão amarelo (*Cucumis melo*)

<sup>b</sup> Relatos das espécies em diversos frutos, tecidos e subprodutos vegetais

Tabela 4: Relatos da literatura de casos clínicos e resistências a medicamentos por espécies isoladas e identificadas do melão amarelo (*Cucumis melo* L.)

Espécies identificadas	Relatos clínicos	Resistência a fármacos
<i>Candida orthopsilosis</i>	Infecções sanguíneas (Gomez-Lopez et al., 2008); infecções fúngicas de ação secundária (Cantón et al., 2011)	Resistência a medicamentos (Hsiu-Jung et al., 2017);
<i>Candida sorboxylosa</i>	Presença em secreções respiratórias de pacientes de onco-hematologia (Niaré-Doumbo et al., 2014)	Sem relatos
<i>Hyphopichia burtonii</i>	<sup>b</sup> Sem relatos	Sem relatos
<i>Kodameae ohmeri</i>	Infecção pulmonar (Diallo et al., 2019); peritonite; fungemia (Huang et al., 2018);	Resistência a fluconazol (Yang et al., 2009); 5-flucitosina (Yanghua et al., 2010)
<i>Metschnikowia</i> sp.	Sem relatos	Sem relatos
<sup>a</sup> <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Infecção e subsequente óbito (Nakazawa et al., 2018); onimicose (Zhang et al., 2020);	Resistência a griseofulvina, anfotericina B (Mukherjee et al., 2014); voriconazol, caspofungina (Mazari et al., 2015)
<sup>a</sup> <i>Pseudozyma churashimaensis</i>	Fungemia (Chowdhary et al., 2020)	Sem relatos
<i>Rhodotorula</i> sp.	Sem relatos	Sem relatos

<sup>a</sup> Os autores identificam as leveduras em seu estágio anamorfo.

<sup>b</sup> Sem relatos de patogenicidade em humanos

Algumas espécies de leveduras identificadas neste estudo são relatadas como agentes de importantes aplicações na biotecnologia. PARK & LEDESMA-AMAR (2018) destacam o gênero *Rhodotorula* na biossíntese de carotenoides e acúmulo de lipídios para as indústrias de alimentos, biocombustíveis, fármacos e cosméticos. MARTINI *et*



*al.* (2016) verificaram que *M. guilliermondii* apresenta alta eficiência na assimilação de xilose. IRIS BETSABEE *et al.* (2017) relatam *M. guilliermondii* como um produtor eficiente de metabólitos com baixos níveis tóxicos, para o controle de fitopatógenos. VENCINO *et al.* (2017) relatam *P. churashimaensis* como uma espécie competente na indústria de cosméticos. SHARMA *et al.* (2018) relataram o potencial fermentativo de *k. ohmeri* e ORTIZ-ÁLVAREZ *et al.* (2019) destacaram a capacidade de *k. ohmeri* em degradar alcanos com presença de metais pesados. TAHEUR *et al.* (2020) constataram a biodegradabilidade de micotoxinas do tipo aflotoxinas por *C. sorboxylosa* e AMIOKON *et al.* (2018) caracterizam essa mesma espécie como termotolerante no processo fermentativo de vinho ao resistir a temperatura de até 42 ° C. FERREIRA *et al.* (2019) caracterizaram *C. orthopsilosis* como agente de alta adesão em superfícies de aço inoxidável e ao látex siliconado, capacidade adesiva essa que é intimamente relacionada com a capacidade de produção de biofilme.

A utilização adequada de corantes no processo de avaliação e/ou quantificação de biofilme, formado por leveduras pode ser considerado um dos fatores determinantes nesse processo. STIEFEL *et al.* (2016), ao avaliarem treze métodos distintos, constatou que a utilização do corante cristal violeta (CV) foi o mais adequado para a quantificação na formação de biofilme. Semelhantemente, PANDA *et al.* (2016) confrontaram quatro métodos de detecção de biofilme e destacaram a ampla eficiência nos métodos que utilizaram o corante CV, assim como ZAHARAN *et al.* (2015) que evidenciaram a eficiência no uso de CV para a mensuração de formação de biofilmes.

Apesar de apresentar larga utilização nos processos de avaliação de biofilme produzidos por microrganismos, esses métodos de avaliação não apresentam um padrão específico, havendo acentuadas divergências nos processos de calibração de amostras para leitura e valores de absorbância utilizados como padrões de comparação.

LEÓN-ROMERO *et al.* (2016), por exemplo, definiram como parâmetro ao potencial relevante na produção do biopolímero o valor mínimo de 1 mg/CCV com calibração de absorbância em filtro de 595 nm (calibração utilizada nesse estudo). NUNES *et al.* (2013) ao avaliarem quantitativamente a eficiência de leveduras na formação de biofilme, calibrou a densidade óptica em 570 nm determinando como baixo produtor as leituras menores que 0,160 CCV, médio com as leituras entre 0,160 à 0,632 CCV e alto com os valores acima de 0,635 CCV.

Genericamente, a padronização na calibragem da densidade óptica não garante uma avaliação equivalente entre diferentes estudos de biofilme, principalmente no que se refere a eficiência dessa produção. CORDERO-BUESO *et al.* (2017), utilizando uma densidade óptica de 590 nm, definiram como cepa potencial aquelas capazes de produzir valores acima de 0,1 CVV e ZAJC *et al.* (2019), seguindo a mesma configuração da densidade óptica, definiram a leitura de absorbância 1,2 CCV como valor mínimo para que a cepa seja categorizada como forte produtora de biofilme.

O comportamento quanto o potencial de formação de biofilmes, apresentadas pelas leveduras desse estudo, incluindo as espécies de *Candida*, assemelha-se ao de FRACCHIA *et al.* (2010) que, ao avaliarem o potencial de biofilme por isolados *Candida albicans*, apontaram a ocorrência de uma fase estacionária, demonstrando uma estagnação, sem redução expressiva, na manutenção do biofilme.

O comportamento da curva de crescimento é particular para cada indivíduo e depende dos aspectos de aptidão, além dos caracteres ambientais e genéticos (HERRICKS *et al.*, 2017). Em suma, o comportamento da curva de crescimento é previsível, porém a padronização das fases em períodos específicos (minutos, horas, dias) é imprevisível. JIANG *et al.* (2019) avaliaram a curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em processo de fermentação microbiana por 72 h e relataram que a fase de crescimento iniciou 8 h após a incubação, chegando ao pico de massa celular após 56 h, com tendências de declínios do volume de massa celular das leveduras a partir de 72 h. FELICIANO *et al.* (2019), ao avaliarem leveduras por 48 horas, relataram que 16 dos 17 isolados apresentaram variações na taxa de crescimento entre 0,11 e 0,24 UFC/h (unidade formadora de colônia por hora) na fase exponencial e que *Candida lusitanae* levou 15 h para alcançar fase estacionária.

As particularidades de comportamentos na produção e manutenção de camadas de biofilme estão relacionadas primordialmente a taxa de crescimento das leveduras em relação ao tempo. Em condições *in vitro*, adicionalmente, outros fatores relacionados a esse desenvolvimento são fundamentais: a idade da cultura, a nutrição disponível, alterações no pH (SHIBATA *et al.*, 2018), estresse salino (SOLIERI *et al.*, 2016), o acúmulo de resíduos metabólicos secretados pela própria cepa, tais como etanol, ácido succínico e glicerol (MEERTS *et al.* 2018) podem se tornar auto tóxicos às colônias e influenciar a taxa de crescimento.

As diferenças observadas quanto a eficiência de formação do biofilme entre os 7 gêneros estudados foram esperadas, bem como o comportamento dos isolados de mesma espécie. Os resultados relacionados a *C. orthopsisilosis*, e seus distintos comportamentos quanto a manutenção das camadas de biofilme ao longo do tempo são compatíveis com os resultados relatados por FERREIRA *et al.* (2019), nos quais houve variações significativas entre isolados de *C. orthopsisilosis*, caracterizados como produtores e não produtores de biofilme. TRENÍÑO-RANGEL *et al.* (2015) relataram comportamento semelhante, observando que isolados de *C. orthopsisilosis* foram associados aos fenótipos de alto e baixo produtor de biofilme, assim como GIACOBINO *et al.* (2016) que pontuaram a relação entre cepas de *C. orthopsisilosis*, observando que 75 % dos isolados testados apresentaram alta produção de biofilme, no entanto, não foram recuperados dados de caráter quantitativos, sobre a eficiência na formação de biofilme por *C. sorboxylosa*.

O comportamento de formação de biofilme, demonstrados pelos isolados de *C. sorboxylosa* e *C. orthopsisilosis* utilizados nesse trabalho, indicam que a eficiência de formação e manutenção de biofilme é relativa e particular a cada isolado. PIRES *et al.* (2016), que relataram alta eficiência de *C. orthopsisilosis*, com uma produção expressiva de camadas de biofilme em 24 h, e produção ascendente até as 48 h, seguida de maturação desse biofilme. Após 72 h de incubação a população *C. orthopsisilosis* avaliada por PIRES *et al.* (2016) encontrava-se heterogênea com células em fase de declínio, morte celular e divisão celular interrompida.

De forma geral, neste trabalho *C. orthopsisilosis* caracterizou-se como a mais eficiente formadora de biofilme. Contudo, vale ressaltar o comportamento das espécies *Metschnikowia* sp., *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula toruloides/sinensis*, consideradas PBhi nos dois primeiros períodos de avaliação. A eficiência na manutenção de biofilme de *M. guilliermondii* é confirmada por DE ANDRADE *et al.* (2017), que ao avaliarem o anamorfo de *M. guilliermondii*, *Candida guilliermondii*, evidenciaram boa produção de biofilme em 48 h. Conforme já mencionado, a falta de padrões comparativos e/ou parâmetros de classificação quanto a eficiência na formação de biofilme, provoca divergências nesse processo. Por exemplo, para CORDERO-BUESO *et al.* (2017), as cepas de *M. guilliermondii* eficientes deveriam apresentar valores de CCV acima de 0,1 (em densidade óptica: 590 nm), parâmetro quantitativo acima do proposto em nosso trabalho. Com a mesma calibração na densidade óptica, ZAJC *et al.* (2019) avaliaram por 48 h o comportamento

*M. guilliermondii*, definindo cepas eficientes com valores de CCV acima de 1,2, semelhantemente, esse tipo de parâmetro também não poderia ser aplicado aos isolados que aqui foram estudados.

Apesar da escassez de estudos realizados *in vitro* que possibilitem comparar nossos resultados, isolados de *M. guilliermondii* são relatados biocontroladores eficientes na proteção de frutos à ataques de fungos filamentosos. TERAO *et al.* (2017) relataram que *M. guilliermondii* apresentou resultados significativos no controle da podridão em mangas (*Mangifera indica* L.), causada por *Botryosphaeria dothide*, sugerindo que entre os principais mecanismos de biocontrole relacionados a essa ação encontra-se a formação de biofilme, que atuaria como uma barreira biológica a ação desse fitopatógeno.

Acerca da espécie *R. toruloides/sinensis*, não foram encontrados dados quantitativos quanto a formação de biofilme, desta forma este estudo é o primeiro a avaliar, quantitativamente, a formação de biofilme por *R. toruloides/sinensis*, em diferentes intervalos de tempo, bem como caracterizar isolados dessa espécie quanto a eficiência na produção e manutenção de biofilme. NUNES *et al.* (2013) avaliaram 61 cepas, de cinco espécies pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, porém *R. toruloides/sinensis* não estava entre as espécies avaliadas. Nesse trabalho os autores apontaram presença de cepas com baixa, média e alta eficiência na formação de biofilme, e como a maioria dos trabalhos de avaliação de biofilme citados, indicaram diferenças significativas entre a capacidade de formação de biofilme de cepas pertencentes a uma mesma espécie.

Sobre os resultados das leveduras do gênero *Metschnikowia* não há relatos de avaliação quantitativa ou qualitativa de sua eficiência na formação de biofilme em diferentes períodos de avaliação. Da mesma forma, as espécies *C. sorboxylosa*, *H. burtonii*, e *P. churashimaensis* não apresentam relatos de avaliação quantitativa da eficiência na formação de biofilme.

A microbiota diversificada e dinâmica de leveduras, coexistindo no pericarpo do melão amarelo *C. melo*, os distintos perfis de aplicabilidades dos gêneros encontrados nesse estudo e a triagem realizada a partir da avaliação da capacidade de formação e manutenção de biofilme em diferentes períodos avaliativos, demonstram a importância de estudos de microbiotas. A adequação da metodologia de avaliação de formação de biofilme a partir dos valores de concentração desse estudo apresentou-se como um fator indispensável para uma leitura e interpretação mais coerentes,

podendo este método ser aplicado a outros gêneros de leveduras para avaliar a capacidade de formação e manutenção de biofilmes quantitativamente.

Esse estudo evidencia a riqueza da microbiota do melão amarelo acerca de populações de leveduras e suas diversas importâncias em áreas como biotecnologia, agricultura, agroindústria e médica. Ressalta-se também a importância em realizar testes-triagens capazes de ranquear indivíduos de gêneros e espécies diferentes de uma microbiota, estudando o comportamento da formação e manutenção de biofilme de cada cepa e classificando-as a partir de um método aplicável para estudos posteriores.

## CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que a microbiota do melão amarelo *C. melo* apresenta leveduras, e essa diversidade expõe diferentes comportamentos na formação e manutenção de biofilme, podendo se comportar com alta, média e baixa eficiência.

Observado que há várias incoerências em métodos de avaliação de biofilme e a ausência de metodologias capazes de categorizar leveduras, quantitativamente, quanto a eficiência na formação e manutenção de biofilme em diferentes períodos, faz-se necessário outros estudos dessa natureza com a padronização de métodos.

Considerando que a microbiota do melão amarelo apresentou uma importante diversidade de leveduras, estudos de outras microbiotas de frutos ou tecidos vegetais são necessários para incremento da literatura a respeito dos métodos de avaliação para formação e manutenção de biofilme.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BLANKENSHIP, J. R. & MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, New York, NY, n. 6, p. 588-594, out. 2006.

BOKHARY, N. A. & HUSSAIN, I. B. (2015). *Kodamaea (Pichia) ohmeri* peritonitis in a nine-year-old child in Saudi Arabia treated with caspofungin. *Journal of Taibah University medical sciences*, n. 4, p. 492-495. 2015.

- CHOWDHARY, A., SHARADA, K., SINGH, P. K., BHAGWANI, D. K., KUMAR, N., de GROOT, T., & MEIS, J. F. Outbreak of *Dirkmeia churashimaensis* Fungemia in a Neonatal Intensive Care Unit, India. *Emerging infectious diseases*, n. 4, p. 764–768. 2020.
- Coradetti, S. T., Pinel, D., Geiselman, G. M., Ito, M., Mondo, S. J., Reilly, M. C. & Simmons, B. A. Functional genomics of lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Elife*, n. 7, e32110. 2018.
- CORBU, V., VASSU, T., & CSUTAK, O. *Pichia (Kodamaea) ohmeri* CMGB-ST19-A NEW STRAIN WITH COMPLEX BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES. *Scientific Journal*, 77. *AgroLife Scientific Journal*, n. 1, 2019.
- CORDERO-BUESO, G., MANGIERI, N., MAGHRADZE, D., FOSCHINO, R., VALDETARA, F., CANTORAL, J. M., & VIGENTINI, I. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*, n. 8, p. 2025. 2017.
- DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU P. & GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capróico: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, SP, n. 2, p. 408-419, jun. 2007.
- DE ANDRADE, M. C. L., DE OLIVEIRA, M. A. S., DOS SANTOS, F. D. A. G., VILELA, P. D. B. X., DA SILVA, M. N., MACÊDO, D. P. C. & DE ARAUJO, R. E. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *PloS one*, n. 11. 2017.
- DIALLO, K., LEFÈVRE, B., CADELIS, G., GALLOIS, J. C., GANDON, F., NICOLAS, M., & HOEN, B. A case report of fungemia due to *Kodamaea ohmeri*. *BMC infectious diseases*, n. 1, p. 570. 2019. 2019.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Atlanta, Georgia, n. 2, p. 167-93, abr. 2002.
- FELICIANO, R. J., ESTILO, E. E. C., NAKANO, H., & GABRIEL, A. A. Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *Food microbiology*, n. 78, p. 73-81. 2019.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* Lavras, MG, n. 6, 1039-1042. Dez. 2011.
- FERREIRA, E. O., MENDES, I. N. V. F., MONTEIRO, S. G., CROSARA, K. T. B., SIQUEIRA, W. L., MOFFA, E. B., & de ANDRADE MONTEIRO, C. Virulence properties and sensitivity profile of *Candida parapsilosis* complex species and *Kodamaea ohmeri* isolates from onychomycosis of HIV/AIDS patients. *Microbial pathogenesis*, p. 132, p. 282-292. 2019.

FEYDER S., De CRAENE, J. O., BAR, S., BERTAZZI, D., L. & FRIANT, S. Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *International Journal of Molecular Sciences*, Strasbourg, France, n. 1, p. 1509-1525, jan. 2015.

FIDALGO, M., BARRALES, R. R., IBEAS, J. I. & JIMENEZ, J. Manuel et al. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Sevilla, Spain, n. 30, p. 11228-11233, mar. 2006.

FINKEL, J. S. & MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, Pennsylvania, USA, doi: 10.1038/nrmicro2475, p. 109–118, dez. 2011.

GRAÇA, A., SANTO, D., ESTEVES, E., NUNES, C., ABADIAS, M., & QUINTAS, C. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food microbiology*, p. 179-185. 2015.

HALL, M. E., LOEB, G. M., CADLE-DAVIDSON, L., EVANS, K. J., & WILCOX, W. F. .Grape sour rot: a four-way interaction involving the host, yeast, acetic acid bacteria, and insects. *Phytopathology*, p. 12, p. 1429-1442. 2018.

HARDING, M. W., MARQUES, L. L R., HOWARD, R. J. & OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in microbiology*, Alberta, Canada, n. 11, p. 475-480, out. 2009.

HERRICKS, T., MASTRO, FD, Li, S., AITCHISON, JD. ODELAY: Um método em larga escala para quantificação multiparâmetros do crescimento de leveduras. *J. Vis. Exp.* e55879, doi: 10.3791 / 55879. 2017.

HIRAI, S., & KAWASUMI, T. Enhanced lactic acid bacteria viability with yeast coinubation under acidic conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, p. 1-8. 2020.

HUANG, J. P., TSAI, K. J., & LIN, J. Unusual fungemia in a patient with metastatic gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Practice*, n. 5, p. 172-174. 2018.

IRIS BETSABEE, O. S., JUAN ARTURO, R. S., & MONTSERRAT, C. S. Evaluation of the toxicity and pathogenicity of biocontrol agents in murine models, chicken embryos and dermal irritation in rabbits. *Toxicology research*, n. 2, p. 188-198. 2017.

JACQUES, N., & CASAREGOLA, S. Large biodiversity of yeasts in French Guiana and the description of *Suhomyces coccinellae* fa sp. nov. and *Suhomyces faveliae* fa sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, n. 6, p. 1634-1649. 2020.

JIANG, H., XU, W., & CHEN, Q. High precision qualitative identification of yeast growth phases using molecular fusion spectra. *Microchemical Journal*, 104211. 2019.

KASNOWSKI, M. C. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, Niterói, RJ, ano 8, n. 15, p. 1-23, jul. 2010.

KESMEN, Z., ÖZBEKAR, E., & BÜYÜKKIRAZ, M. E. Multifragment melting analysis of yeast species isolated from spoiled fruits. *Journal of applied microbiology*, n. 2, p. 522-534. 2018.

KHUNNAMWONG, P., JINDAMORAKOT, S., & LIMTONG, S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach. *Fungal biology*, n. 8, p. 785-799. 2018.

KHUNNAMWONG, P., LERTWATTANASAKUL, N., JINDAMORAKOT, S., SUWANNARACH, N., MATSUI, K., & LIMTONG, S. Evaluation of antagonistic activity and mechanisms of endophytic yeasts against pathogenic fungi causing economic crop diseases. *Folia Microbiologica*, p. 1-18. 2019.

LEE, G., LEE, S. H., KIM, K. M., & RYU, C. M. Foliar application of the leaf-colonizing yeast *Pseudozyma churashimaensis* elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens. *Scientific reports*, n. 1, p. 1-13. 2017.

LEÓN-ROMERO, Á., DOMÍNGUEZ-MANZANO, J., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A., ARROYO-LÓPEZ, F. N., & JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Formation of in vitro mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 2, p. 689-695. 2016.

MARTINI, C., TAU-K-TORNISIELO, S. M., CODATO, C. B., BASTOS, R. G., & CECCATO-ANTONINI, S. R. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, n. 5, p. 80. 2016.

MAZARI, W., BOUCHERIT-OTMANI, Z., & BOUCHERIT, K. In vitro susceptibility of amphotericin-B, voriconazole and caspofungin against *Candida guilliermondii* biofilms, isolated from dentals units water pipes, under different growth phases. *Journal de mycologie medicale*, n. 1, p. 57-62. 2015.

MEERTS, M., CERVERA, A. R., STRUYF, N., CARDINAELS, R., COURTIN, C. M., & MOLDENAERS, P. The effects of yeast metabolites on the rheological behaviour of the dough matrix in fermented wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, n. 82, p. 183-189. 2018.

MOUBASHER, A. A. H., ABDEL-SATER, M. A., & SOLIMAN, Z. biodiversity of filamentous and yeast fungi in citrus and grape fruits and juices in assiut area, Egypt. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, n. 5, p. 353-365. 2020.

MUKHERJEE, S., MUKHERJEE, N., SAINI, P., GAYEN, P., ROY, P., & BABU, S. P. S. Molecular evidence on the occurrence of co-infection with *Pichia guilliermondii* and *Wuchereria bancrofti* in two filarial endemic districts of India. *Infectious diseases of poverty*, n. 1, p. 13. 2014.

NAKAZAWA, H., NISHINA, S., SENOO, Y., SAKAI, H., ITO, T., Kikuchi, K., & ISHIDA, F. Breakthrough *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) fungemia after



cord blood transplantation for extranodal NK-cell lymphoma with azole prophylaxis. *Transplant Infectious Disease*, n. 4, p. 12922. 2018.

NIU, C., YUAN, Y., HU, Z., WANG, Z., LIU, B., WANG, H., & YUE, T. Accessing spoilage features of osmotolerant yeasts identified from kiwifruit plantation and processing environment in Shaanxi, China. *International journal of food microbiology*, n. 232, p. 126-133. 2016.

NUNES, J. M., BIZERRA, F. C., e FERREIRA, R. C., & COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, n. 1, 382-389. 2013.

ORTIZ-ÁLVAREZ, J., VERA-PONCE de L., A., TREJO-CERRO, O., VU, H. T., CHÁVEZ-CAMARILLO, G., VILLA-TANACA, L., & HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. *Candida pseudoglebosa* and *Kodamaea ohmeri* are capable of degrading alkanes in the presence of heavy metals. *Journal of basic microbiology*, n. 8, p. 792-806. 2019.

PANDA, P. S., CHAUDHARY, U., & DUBE, S. K. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, n. 2, p. 177. 2016.

Park, Y. K., Nicaud, J. M., & Ledesma-Amaro, R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, n. 3, 304-317. 2018.

PARSEK M. R. & FUQUA C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *Journal of Bacteriology*, Iowa City, Iowa, n. 14, p. 4427–4440, jul. 2004.

PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, SP, n. 4, p.340-344, dez. 2001.

PU, L., JINGFAN, F., KAI, C., CHAO-NA, L., YUNJIANG, C. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, Wuhan, China, doi: 10.1111/1567-1364.12139, p. 536–546, fev. 2014.

SARAN, S., MATHUR, A., DALAL, J., & SAXENA, R. K. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, p. 324-331. 2017.

SHARMA, S., ARORA, A., SHARMA, P., SINGH, S., NAIN, L., & PAUL, D. Notable mixed substrate fermentation by native *Kodamaea ohmeri* strains isolated from *Lagenaria siceraria* flowers and ethanol production on paddy straw hydrolysates. *Chemistry Central Journal*, n. 1, p. 8. 2018.

SHIBATA, K., OBASE, K., ITOH, K. & AMEMIYA, T. The effects of starvation and acidification on lag phase duration of surviving yeast cells. *Journal of biotechnology*, p. 60-64. 2018.

SOLIERI, L., VEZZANI, V., CASSANELLI, S., DAKAL, T. C., PAZZINI, J., & GIUDICI, P. Differential hypersaline stress response in *Zygosaccharomyces rouxii* complex yeasts: a physiological and transcriptional study. *FEMS yeast research*, n. 6. 2016.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. "Biofilm formation in food industries: A food safety concern", *Food Control*, Korea, doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001, p. 572-585, jun. 2013.

STIEFEL, P., ROSENBERG, U., SCHNEIDER, J., MAUERHOFER, S., MANIURA-WEBER, K., & REN, Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied microbiology and biotechnology*, n. 9, p. 4135-4145. 2016.

SUN L, LIAO K & WANG D. Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. *PLOS ONE*, Korea, n. 2, fev. 2015.

TAHEUR, F. B., MANSOUR, C., JEDDOU, K. B., MACHREKI, Y., KOUIDHI, B., ABDULHAKIM, J. A., & CHAIEB, K. Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. *Toxicon*, p. 76-83. 2020.

TAMURA, N. K., NEGRI, M. F. N., BONASSOLI, L. A. & SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, MG, n. 1, p. 91-93, fev. 2007.

TERAO, D., NECHET, K. L. & HALFELD-VIEIRA, B. A. Competitive and colony layer formation ability as key mechanisms by yeasts for the control *Botryosphaeria dothidea* fruit rot of mango. *Tropical Plant Pathology*, n. 6, p. 451-457. 2017.

TREVIÑO-RANGEL, R. D. J., RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, I. P., ROSAS-TARACO, A. G., HERNÁNDEZ-BELLO, R., GONZÁLEZ, J. G., & GONZÁLEZ, G. M. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. *Revista iberoamericana de micología*, n. 3, p. 180-184. 2015.

VECINO, X., CRUZ, J. M., MOLDES, A. B., & RODRIGUES, L. R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Critical reviews in biotechnology*, n. 7, p. 911-923. 2017.

WANG, X., GLAWE, D. A., KRAMER, E., WELLER, D., & OKUBARA, P. A. Biological control of *Botrytis cinerea*: interactions with native vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology*, n. 6, p. 691-701. 2018.

YANG, B. H., PENG, M. Y., HOU, S. J., SUN, J. R., LEE, S. Y., & Lu, J. J. Fluconazole-resistant *Kodamaea ohmeri* fungemia associated with cellulitis: case report and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, n. 6, p. 493-497. 2009.

YANGHUA, Q., WEIWEI, W., YANG, L., JIAN, X., & QIAN, S. Isolation, identification, and antifungal susceptibility test for *Kodamaea ohmeri*: a case report on endocarditis. *Journal of Medical Colleges of PLA*, n. 4, p. 252-256. 2010.

ZAHRAN, K. M., AGBAN, M. N., AHMED, S. H., HASSAN, E. A., & SABET, M. A. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. *Journal of medical microbiology*, p. 4, p. 375-381. 2015.

ZAHRAN, K. M., AGBAN, M. N., AHMED, S. H., HASSAN, E. A., & SABET, M. A. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. *Journal of medical microbiology*, n. 4, p. 375-381. 2015.

ZAJC, J., GOSTINČAR, C., ČERNOŠA, A., & GUNDE-CIMERMAN, N. Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*, n. 1, 42. 2019.

ZHANG, M. J., LIANG, G. Z., MEI, H., & SONG, G. Onychomycosis caused by *Pichia guilliermondii*: A case report and mini-review. *Medical Mycology Case Reports*, n. 27, p. 72-76. 2020.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo da riqueza de espécies de leveduras encontradas na microbiota do melão amarelo (*C. melo*) e no ranqueamento destas, quanto a eficiência em formar e manter camadas de biofilme em diferentes períodos avaliativos, por meio de um método adaptado para obter dados quantitativos de concentração de células formadoras do biopolímero, consideramos que este trabalho apresenta três informações fundamentais:

- i) A microbiota do melão amarelo (*C. melo*) apresenta riqueza significativa em espécies de leveduras coexistindo entre si, demonstrando diferentes perfis de agentes formadores de biofilme;
- ii) A importância em promover teste-triagem, ranqueando leveduras de gêneros e espécies distintas e comparando-as entre si até o nível espécie-espécie e observando que indivíduos de mesma espécie apresentam diferenças mínimas a diferenças expressivas;
- iii) Há uma escassez imensa em métodos que avaliam, quantitativamente, a formação de biofilme, sendo métodos qualitativos mais hipotéticos que promissores. Mesmo quando o método é quantitativo a falta de padronização nos parâmetros de avaliação, muitas vezes impossibilita a verificação coerente de resultados relatados e, neste estudo consideramos apresentar um método de avaliação adaptado valorizando leituras quantitativas e ranqueamentos estabelecidos a partir de valores de concentração de células formadoras de biofilme.

Consideramos que o estudo de microbiotas de frutos ou outro órgão ou tecido vegetal devam ser mais frequentes, visto que os resultados desse trabalho apontam evidências que estas estruturas vegetais abrigam populações dinâmicas de leveduras

com ampla riqueza de gênero e espécies, além de fornecer informações importantes no mecanismo de formação de biofilme. As leveduras apresentam diversos mecanismos e nesse trabalho observamos apenas o biofilme, sugere-se, pois, que há um vasto campo de possibilidades para aferições de outros mecanismos por parte das leveduras.