

Editora Dra. Gislaine Fongaro

TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS SUSTENTÁVEIS PARA FINS DE SAÚDE ÚNICA

**PROSPECÇÃO DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS**

**PATÓGENOS VIRAIS
E PARASITÁRIOS**

**CULTIVO CELULAR
*IN VITRO***

CITOTOXICIDADE

**INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL**



Bioprospecção de metabólitos de leveduras para fins biotecnológicos aplicados à saúde

DOI: 10.56041/9786599841859-5

DOS SANTOS, Angela Alves

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-8621-4311>

TADIOTO, Viviani

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-76285175>

GIEHL, Anderson

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil

<https://orcid.org/0000-000252783436>

BRESSAN, Stéfany Kell

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0009-0000-9942-648X>

WERLANG, Larissa

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil

<https://orcid.org/0009-0007-4750-8505>

OLIVEIRA, Camila Girardi

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/009-0003-7957-7426>

DINIZ, Mariana Da Costa

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-7692-9893>

PEREIRA, Triciane Tornai

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
<https://orcid.org/0009-0001-2572-9186>

SILVA, Izabella Thaís

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>

FONGARO, Gislaine

Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil
Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.
<https://orcid.org/0000-000155963320>

ALVES, Sérgio Luiz Jr.*

Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC, Brasil
Programa de Pós-graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Cerro Largo/RS, Brasil.
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-7787-971X>

*Autor Correspondente: slalvesjr@uffs.edu.br

RESUMO

As leveduras, fungos unicelulares amplamente empregados na indústria de alimentos e bebidas, estão desempenhando um papel cada vez mais relevante na síntese de metabólitos naturais para fins biotecnológicos. Esses metabólitos, de natureza diversificada, encontram aplicações em diversos setores, particularmente na área da saúde, e abrangem uma variedade de moléculas com atividades biológicas vantajosas, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. Nesse contexto, este capítulo visa explorar as leveduras que ocorrem naturalmente como produtoras de metabólitos bioativos, explanando os tipos de compostos que elas produzem e destacando suas potenciais aplicações em benefício da saúde humana. Também são discutidas as abordagens biotecnológicas mais promissoras para a produção de metabólitos terapêuticos a partir de leveduras, que incluem (1) o isolamento de leveduras e a otimização de processos de fermentação e extração dos compostos, (2) a engenharia genética de leveduras para melhorar a produção desses compostos, e (3) testes de citotoxicidade e avaliação do potencial terapêutico dos metabólitos de leveduras. Em síntese, as leveduras desempenham um papel crucial na produção de metabólitos naturais com múltiplas propriedades benéficas para a saúde, e este capítulo investiga as estratégias e avanços biotecnológicos que estão impulsionando o potencial terapêutico desses compostos.

Palavras-chave: Compostos bioativos; antimicrobianos; antioxidantes; anticâncer; biotecnologia.

INTRODUÇÃO

As leveduras têm papel fundamental na história da humanidade, sobretudo na produção de alimentos e bebidas (Rani et al., 2021). Com o avanço da ciência, esses microrganismos encontraram novas aplicações na pesquisa genética e na indústria farmacêutica, contribuindo também para a produção de medicamentos e enzimas (Kulagina et al., 2021). No entanto, para além dessas aplicações, as leveduras representam também uma rica fonte de metabólitos bioativos — substâncias com diversas funções biológicas. Entre esses compostos, alguns apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antineoplásicas, o que se traduz em oportunidades para o desenvolvimento de novos medicamentos, com a perspectiva de maior eficácia e menores efeitos colaterais em comparação as opções de tratamento existentes (Rahmat & Kang, 2020). Metabólitos antibacterianos, por exemplo, podem assumir uma importância ainda maior em um cenário onde o aumento das cepas bacterianas resistentes a antibióticos se tornou um desafio global (Muccilli & Restuccia, 2015).

Considerando este campo promissor, as seções a seguir apresentam metabólitos produzidos por leveduras que possuem propriedades terapêuticas, bem como os ambientes naturais dos quais essas leveduras vêm sendo isoladas. Ao final, algumas formas de isolar leveduras e extrair tais compostos, o papel da engenharia genética no aumento da produtividade e, ainda, como são realizados os testes de citotoxicidade desses metabólitos também são

abordados.

LEVEDURAS COMO FONTES DE METABÓLITOS NATURAIS COM PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

As leveduras são eucariotos unicelulares encontrados na natureza em diferentes condições de crescimento, incluindo ambientes extremos. Essa característica pode proporcionar a aplicação desses organismos na preservação ambiental e em distintos setores da indústria. Além do uso tradicional na fermentação de pães e bebidas, as leveduras podem contribuir para o biocontrole de organismos indesejados (Muccilli & Restuccia, 2015) através da competição por ambiente e nutrientes (Liu et al., 2013) e, entre outros fatores, pela síntese de compostos que atenuam, e até mesmo impedem, a sobrevivência de outros organismos (Schmitt & Breinig, 2006).

Diversas leveduras podem sintetizar, por exemplo, toxinas *killer*, que são de grande aplicabilidade no controle de organismos patogênicos (incluindo organismos resistentes aos antibióticos usados atualmente), e na biopreservação de alimentos pela ação antifúngica (Marquina et al., 2002; Muccilli & Restuccia, 2015). A levedura *Pichia kudriavzevii*, por exemplo, secreta a toxina *killer* RY55, que apresenta atividade antibacteriana diante de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (Bajaj et al., 2013). De forma similar, a levedura *Pichia anomala* apresenta atividade antifúngica, além de poder atuar em processos de biorremediação (Walker, 2011).

Outra característica importante das leveduras é o metabolismo fermentativo, isto é, esses organismos podem converter carboidratos em álcool ou ácido, eliminando dióxido de carbono, para obtenção de energia (Maicas, 2020). Nesse sentido, as leveduras são organismos potenciais para melhoria da nutrição humana. *Brettanomyces claussenii*, por exemplo, pode utilizar a lactose durante o processo fermentativo do leite permeado, gerando produtos com baixo teor de glicose e ricos em galactose (Rivera Flores et al., 2023). Por meio da capacidade fermentativa, leveduras podem ser usadas, ainda, na biossíntese de produtos naturais que substituem o açúcar, como oligossacarídeos (2'-fucosilactose e trealose), álcoois de açúcar (como eritritol e xilitol), glicosídeos (rubusosídeos e glicirrizina), além de monossacarídeos raros como D-psicose e D-tagatose (Li et al., 2023).

Microrganismos extremófilos, adaptados a ambientes de condições extremas, desempenham um papel crucial na pesquisa científica, e a Antártica tem sido um foco importante nesse contexto. Leveduras encontradas no solo ou até mesmo na água em regiões polares desenvolveram notáveis estratégias de sobrevivência e tolerância ao estresse, e demonstram potencial na produção de novas enzimas e metabólitos secundários, como compostos bioativos (Zucconi et al., 2020). De maneira similar, leveduras isoladas em altas altitudes, expostas constantemente a radiação ultravioleta, desenvolveram como estratégias de sobrevivência a produção compostos com capacidade fotoprotetora como a micosporina. Leveduras do clado *Erythrobasidium* e *Tremellales*, por exemplo, isoladas da Patagônia (Argentina) apresentam

micosporinas absorventes de ultravioleta (310320 nm) (Libkind et al., 2005). Além disso, leveduras encontradas em lagos com alta altitude na Antártica como *Cryptococcus antarcticus*, *Rhodotorula laryngis* e *Exophiala xenobiotica* também são produtoras de micosporinas (Vaz et al., 2011).

Algumas leveduras também podem produzir e liberar exopolissacarídeos (EPS), polímeros de carboidrato com alto peso molecular que podem apresentar atividade antioxidante. Nesse sentido, a cepa *Rhodotorula mucilaginosa* GOMAS16 demonstrou liberar EPS com maior atividade antioxidante do que a de biopolímeros como ácido hialurônico (Hamidi et al., 2020). Leveduras isoladas na Ilha Livingston, *Cryptococcus laurentii* AL65, *Sporobolomyces salmonicolor* AL36, *Debaryomyces hansenii*, *Leucosporidium scottii* e *Rhodotorula glutinis*, também se mostram produtoras de EPS. Essas leveduras são também grandes produtoras de aminoácidos como leucina, alanina e valina, com aplicações em tratamentos médicos (Rusinova-Videva et al., 2019). O Quadro 1 destaca outros metabólitos gerados por leveduras, bem como suas propriedades terapêuticas, evidenciando a diversidade de compostos com atividade biológica que podem ser produzidos por esses microrganismos.

Quadro 1 – Exemplos de metabólitos produzidos por leveduras e suas propriedades terapêuticas

Levedura	Composto	Propriedade terapêutica	Referência
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Coenzima Q10 e β -caroteno	Barreira contra radiação ultravioleta	(Dimitrova et al., 2010)
<i>Cryptococcus laurentii</i>			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Terpenos	Anti-inflamatórios, anticancerígenos e neuroprotetores	(Kiyama, 2017; Worland et al., 2020)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			(Liang et al., 2021)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hiosciamina e escopolamina	Atividade anticolinérgica	(Cardillo et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Antocianinas e flavonóides	Atividade antioxidante	(Martín-Gómez et al., 2021)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Ácido gálico e catequina		(Vieira et al., 2016)

Os carotenóides — compostos orgânicos secundários, solúveis em gordura e facilmente encontrados na natureza — também podem ser produzidos por leveduras. Estes compostos são responsáveis pelos pigmentos avermelhados, alaranjados ou amarelados presentes nas frutas, vegetais e óleos (Li et al., 2022). Além de sua função como pigmentos naturais, essas moléculas possuem alta atividade antioxidante, previnem doenças cardiovasculares e oculares, são capazes de aumentar a imunidade e são também a principal fonte de vitamina A (Johra et al., 2020; Kot et al., 2018; Krinsky & Johnson, 2005).

Apesar dos inúmeros benefícios que oferecem, os carotenóides não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, precisam ser suplementados. Atualmente, mais de 90% dos carotenóides necessários em aplicações industriais são produzidos por métodos químicos. Entretanto, a produção química poderia ser facilmente substituída por microrganismos (Kot

et al., 2018; Tang et al., 2019). Nesse sentido, leveduras pigmentadas do gênero *Rhodotorula*, além de leveduras da classe Tremellomycetes, como *Cystofilobasidium infirmomiiatum* e *C. capitatum*, e outras da classe Microbotryomycetes, como *Rhodosporidium babjevae* e *Sporobolomyces ruberrimus*, são capazes de produzir carotenóides como β -caroteno, toruleno e torularodina, compostos que apresentam funções antimicrobianas e antioxidantes, além de propriedades antitumorais (Burton et al., 2021; Kot et al., 2018; Z. Li et al., 2022).

USO DE METABÓLITOS DE LEVEDURAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

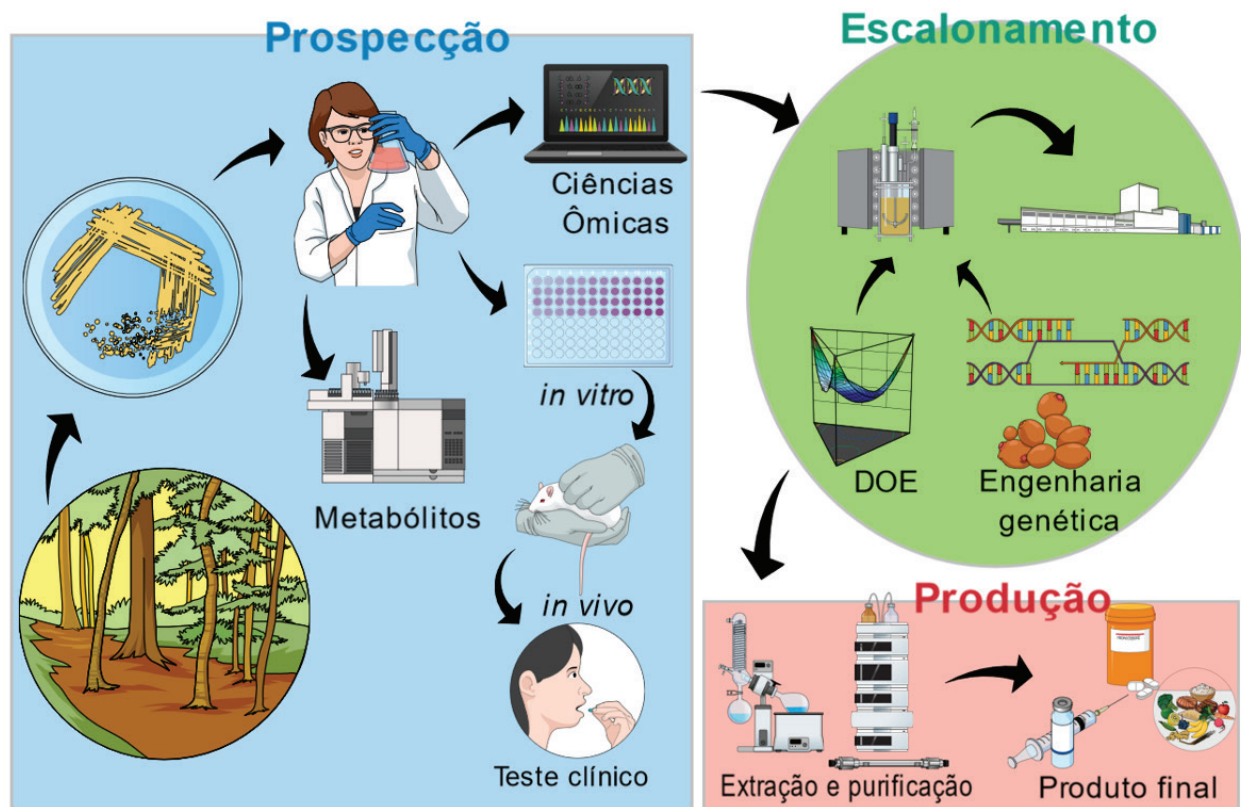
Os estudos sobre compostos produzidos por leveduras com potencial antitumoral estão em constante evolução. Alguns compostos, como os β -D-glucanos, apresentam propriedades antitumorais promissoras. Estudos iniciais sugerem que os β -D-glucanos — polissacarídeos encontrados em diversas fontes, incluindo algumas leveduras, fungos e cereais, como a cevada e a aveia — têm propriedades imunomoduladoras e atividade antitumorais, estimulando o sistema imunológico, especialmente os macrófagos, na defesa contra o câncer (Abreu et al., 2015). No entanto, mais pesquisas clínicas são necessárias para confirmar sua eficácia e segurança. Além disso, o β -D-glucano pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando na morte celular, embora o mecanismo exato ainda não seja completamente compreendido (Abreu et al., 2015).

Ainda no contexto de metabólitos de leveduras com atividade antitumoral, o potencial terapêutico da enzima L-asparaginase, produzida por leveduras como *Candida utilis*, *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*, também é digno de nota (Arima et al., 1972; Soler, 2016). Essa enzima possui propriedades antitumorais, onde sua ação envolve a hidrólise da L-asparagina, um aminoácido essencial para o crescimento de certas células tumorais (Killander et al., 1976). A redução da L-asparagina impede a síntese de proteínas, inibindo a multiplicação das células tumorais (Soler, 2016). Essa molécula pode, portanto, ser utilizada no tratamento de leucemias linfoblásticas agudas e linfomas, geralmente em combinação com outros agentes quimioterápicos, variando de acordo com o tipo e o estágio do câncer e as condições dos pacientes (El-Nagga et al., 2014).

ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS TERAPÊUTICOS A PARTIR DE LEVEDURAS

Como já visto nas seções anteriores, a biodiversidade de leveduras existente no planeta se torna uma fonte de novos produtos ou mesmo de moléculas já conhecidas, além de auxiliar na resolução de problemas ainda não resolvidos na medicina atual, e trazer uma forma mais sustentável na síntese de fármacos, bem como uma economia que valoriza a importância da existência da biodiversidade (Tadioto et al., 2023). Para realizar essa bioprospecção, são necessárias abordagens integradas que vão desde o isolamento das leveduras até o escalonamento do produto de interesse, por meio de várias técnicas e processos laboratoriais, farmacológicos e industriais (Figura 1).

Figura 1 - Métodos integrados para a bioprospecção de metabólitos de leveduras: técnicas de coleta seletiva e isolamento são essenciais, juntamente com testes fenotípicos e abordagens *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, e clínicas. Uma vez identificados os compostos de interesse, o escalonamento da produção requer um conhecimento aprofundado das variáveis envolvidas, com métodos como o Design de Experimentos (DOE) e biologia molecular. Podem ser requeridas, ainda, extrações e purificações dos produtos, variando de processos unitários convencionais a técnicas de cromatografia, dependendo das concentrações e natureza dos metabólitos ou proteínas produzidos.



ISOLAMENTO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS TERAPÊUTICOS

No contexto da prospecção de leveduras naturalmente produtoras de compostos terapêuticos, inicialmente, é necessário isolar essas leveduras do ambiente. Nesse sentido, devem ser consideradas as características adaptativas tanto para a escolha do tipo de amostra, quanto no processo de isolamento, e é importante a utilização de meios e condições de cultivo seletivos, de modo a propiciar condições que evidenciem as características fenotípicas das linhagens que serão isoladas (de Souza et al., 2023; Tadioto et al., 2022).

Após a obtenção das culturas puras, são necessários testes fenotípicos que avaliem a capacidade de produção de compostos antitumorais, antibacterianos, virucidas, ou até mesmo do potencial probiótico e nutracêutico dos metabólitos. Concomitantemente, as abordagens *in silico* (Atanasov et al., 2021) podem auxiliar na busca de genes que conferem o metabolismo da produção dos compostos de interesse, no screening de possíveis proteínas e metabólitos secundários que possam ser aplicadas em testes posteriores *in vitro*, *in vivo* e clínicos, após o conhecimento da molécula contendo o princípio ativo (Saeidnia et al., 2016).

Assim que comprovado o potencial terapêutico ou nutricional, o escalonamento para a produção do bioproduto é necessário. Em vista da pouca exigência das leveduras quanto as fontes de carbono (Parapouli et al., 2020), é necessário conhecer as demais variáveis que influenciam na maior produção dos metabólitos e proteínas de interesse a fim de otimizar a produção. Metodologias como o Design de Experimentos (DOE) (Knight, 2010) e de biologia molecular auxiliam no aumento da produtividade ou rendimento (Lebozec et al., 2018; Martínez et al., 2012), assim como facilitam o processo de escalonamento ao auxiliar na compreensão em nível bioquímico da reação de conversão de substrato em produto.

Por fim, os métodos de extração e purificação do produto final dependem das concentrações de produto geradas, já compreendidas pelas abordagens prévias descritas nesta seção. Quando produzida em quantidades maiores, processos unitários convencionais podem ser empregados, como a destilação, filtração, adsorção e separação por fase (He et al., 2016; Ventura et al., 2017). Contudo, como alguns desses metabólitos ou proteínas são produzidos em pequenas quantidades, técnicas de cromatografia se tornam necessárias para a separação e purificação do produto (Gurramkonda et al., 2010).

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS TERAPÊUTICOS UTILIZANDO LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

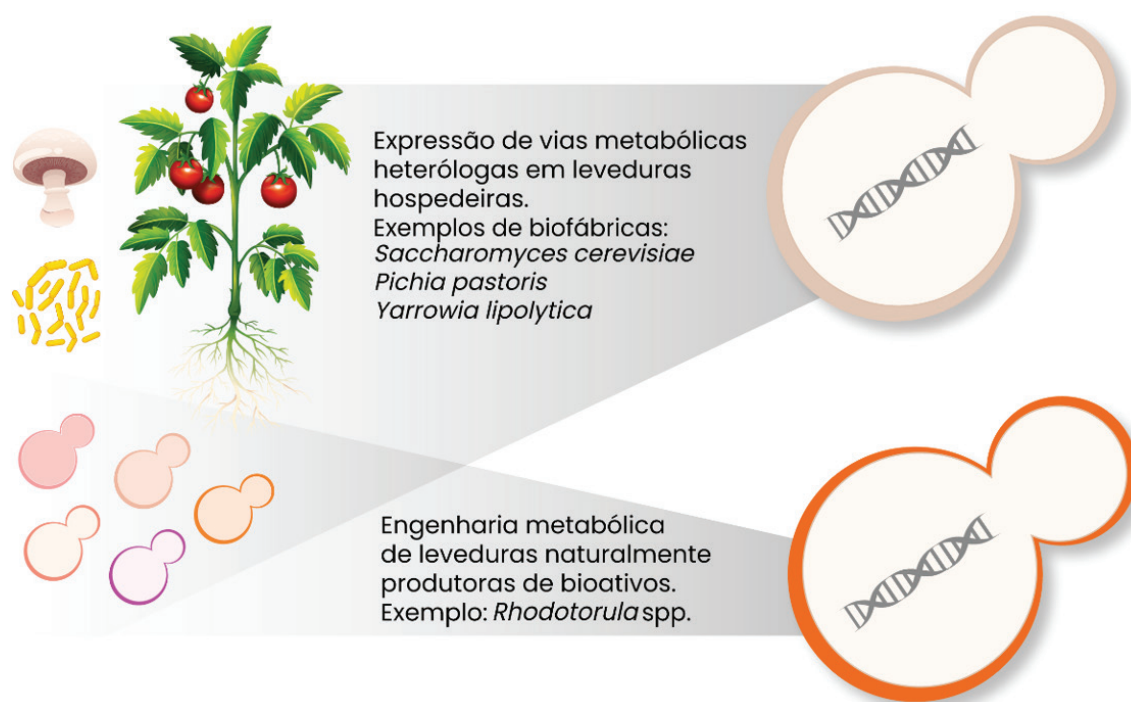
As leveduras têm sido microrganismos valiosos na indústria biotecnológica, servindo como biofábricas no desenvolvimento de vários bioprodutos, principalmente biocombustíveis e proteínas e, mais recentemente, metabólitos terapêuticos. O desenvolvimento e o aperfeiçoamento da tecnologia do DNA recombinante e das ferramentas de biologia sintética vêm permitindo a modificação genética de várias espécies de leveduras, fornecendo vias otimizadas para a síntese de diversas moléculas (Wagner & Alper, 2016). Técnicas mais recentes, como a edição de genoma utilizando CRISPR/Cas9, ampliaram ainda mais a engenharia desses microrganismos, proporcionando modificações mais precisas e direcionadas (Jinek et al., 2012; Raschmanová et al., 2018).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, além de sua histórica aplicação na indústria de bebidas, alimentos e biocombustíveis, já é empregada também na produção de biofármacos comerciais, que incluem hormônios recombinantes, vacinas e anticorpos (Kulagina et al., 2021). Além disso, pesquisas utilizando *S. cerevisiae* recombinantes também exploram a produção de compostos naturais com atividade bioativa; metabólitos, estes, encontrados em plantas, bactérias, fungos e outras leveduras (Figura 2). Muitas vezes, os organismos que originalmente sintetizam os compostos bioativos de interesse o fazem com baixo rendimento ou são difíceis de ser empregados na síntese de nível industrial; é aí que entram as “fábricas microbianas”, com microrganismos, como *S. cerevisiae*, que podem ser manipulados geneticamente para produzir o composto alvo e que suportam ambientes industriais (Madhavan et al., 2021). Nesse sentido, *S. cerevisiae* já foi utilizada como hospedeiro heterólogo para aumentar a bioprodução de alcalóides, terpenóides e fenilpropanóides naturais de plantas, como o opioide tebaína (Galanie et al., 2015), o triterpeno ginsenosídeo Rh2 (Zhuang et al.,

2017) e o flavonóide escutelarina (Liu et al., 2018).

A engenharia genética de leveduras para permitir e/ou aumentar a produção compostos bioativos não está limitada à *S. cerevisiae*. Outras leveduras, como *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica*, vêm ganhando destaque por apresentarem uma capacidade biossintética alta, conhecimento genético disponível, e ainda serem capazes de consumir fontes de carbono de baixo custo, como hidrolisados lignocelulósicos (Patra et al., 2021; Rebello et al., 2018). Além disso, leveduras naturalmente produtoras de bioativos também têm sido objeto de pesquisas envolvendo a engenharia genética, como algumas espécies do gênero *Rhodotorula*, que podem acumular carotenóides (Lee et al., 2016; Pi et al., 2018). *Rhodotorula glutinis*, por exemplo, foi modificada geneticamente por Pi e colaboradores (2018) para aumentar a produção de β -caroteno, e, simultaneamente, produzir celulases heterólogas, visando a aplicação da levedura em hidrolisados lignocelulósicos no contexto das biorrefinarias.

Figura 2 – Estratégias de engenharia genética para permitir e/ou aumentar a produção de metabólitos bioativos utilizando leveduras.



Em suma, conforme ilustrado na Figura 2, as atuais ferramentas de engenharia genética oferecem uma valiosa contribuição para a produção de metabólitos bioativos em leveduras. Isso pode ser alcançado de duas maneiras principais: possibilitando a produção de compostos de outros organismos (como plantas, fungos, bactérias e outras leveduras) por meio de expressão heteróloga e utilização de leveduras como biofábricas; ou, ainda, permitindo a otimização das vias metabólicas intrínsecas em leveduras que já são capazes de produzir os compostos de interesse.

TESTES DE CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO

A bioprospecção de metabólitos secundários com potencial terapêutico requer uma triagem inicial que inclui a avaliação da citotoxicidade, essencial para identificar moléculas bioativas (Kulagina et al., 2021; Rahmat & Kang, 2020; Upreti et al., 2022). Esse processo permite identificar compostos que podem afetar negativamente a viabilidade e a integridade celular, fornecendo informações fundamentais sobre a segurança e a eficácia de candidatos a novos produtos farmacêuticos (Madorran et al., 2022; Tabana et al., 2023). Para esse tipo de avaliação, são utilizados os testes de citotoxicidade, os quais são procedimentos laboratoriais delineados para determinar a capacidade de uma substância em afetar a sobrevivência e/ou a função celular (Garcia-Hernando et al., 2020; Li et al., 2015). Esses ensaios são conduzidos em diversas linhagens celulares e podem envolver uma variedade de parâmetros, como viabilidade, proliferação, apoptose e genotoxicidade (Banfalvi, 2017; Luan & Honma, 2022; Madorran et al., 2022).

De maneira geral, os testes citotóxicológicos podem ser classificados em dois principais tipos: *in vitro* e *in vivo* (Greco et al., 2020; Hirsch & Schildknecht, 2019). Os testes *in vitro* são conduzidos em culturas de células isoladas, permitindo uma análise controlada e detalhada dos efeitos da substância em teste (Chapman et al., 2021; Kitaeva et al., 2020). Entre as técnicas metodológicas utilizadas estão ensaios de sal de tetrazolium (MTT), sulforrodamina B (SRB), exclusão do corante azul tripan e a avaliação da atividade enzimática lactato desidrogenase (LDH) (Coyle et al., 2023; Mani & Swargiary, 2023; Mosmann, 1983; Skehan et al., 1990; Smith et al., 2011; Vajrabhaya & Korsuwannawong, 2018; Van den Bossche et al., 2020). Os resultados obtidos nos testes *in vitro* são valiosos para a triagem inicial dos compostos com potenciais terapêuticos, assim como para a compreensão dos mecanismos subjacentes à toxicidade celular (Kitaeva et al., 2020; Pan et al., 2020). Já os testes *in vivo* envolvem a avaliação da citotoxicidade sistêmica, a toxicocinética e a toxicodinâmica de substâncias em um ambiente mais complexo, o que implica a administração da substância em organismos vivos, ou seja, modelos animais de laboratório, como ratos e camundongos (Ahmed et al., 2023; Greco et al., 2020).

Posteriormente aos testes iniciais, já na etapa pré-clínica, as substâncias promissoras passam por avaliações terapêuticas detalhadas, incluindo a análise da farmacocinética, farmacodinâmica, eficácia pré-clínica e toxicologia (Hirsch & Schildknecht, 2019; Salehi et al., 2019). Esses testes visam determinar a segurança, eficácia e potencial toxicidade das substâncias, bem como seus efeitos a longo prazo (Crandon & Nicolau, 2012; Huang et al., 2019; Shahid et al., 2020; Tanner et al., 2019; Tubau-Juni et al., 2018).

A integração dos testes de citotoxicidade e a avaliação do potencial terapêutico desempenham um papel essencial na aplicação dos metabólitos para o avanço das novas terapias; esses procedimentos fornecem informações experienciais para garantir a segurança e eficácia de novos compostos, contribuindo para orientar as decisões na pesquisa farmacêutica e biomédica (Espíndola et al., 2022; Garcia-Hernando et al., 2020). À medida que ocorre a

progressão no desenvolvimento de terapias mais avançadas e personalizadas, a aplicação dessas técnicas continua sendo fundamental para impulsionar a inovação nas áreas das ciências da saúde.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa e a aplicação de metabólitos produzidos por leveduras têm grande potencial na biotecnologia, com muitos destes compostos apresentando atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. Nesse contexto, estudos que visam aprimorar a produção e a extração desses metabólitos a partir de leveduras estão impulsionando sua aplicabilidade. Ainda neste campo, a engenharia genética vem permitindo a produção de metabólitos específicos por meio das biofábricas microbianas, auxiliando no ajuste das vias metabólicas e da produtividade. No entanto, é crucial a realização de testes de citotoxicidade e a avaliação terapêutica, para garantir a segurança e eficácia clínica desses metabólitos. Em suma, a bioprospecção de metabólitos produzidos por leveduras desempenha um papel fundamental na descoberta de novos compostos com atividade biológica, o que pode ampliar a gama de produtos terapêuticos, incluindo, por exemplo, compostos para o tratamento de doenças complexas como o câncer.

REFERÊNCIAS

- Abreu, J. A. S., Rovida, A. F. S., & Pamphile, J. A. (2015). Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista Uningá Review*, 2(1), 5559.
- Ahmed, W., El-Gogary, R. I., Nasr, M., & Sammour, O. A. (2023). Development and in Vitro/In Vivo Evaluation of Itopride Hydrochloride Expanding Tablets. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. <https://doi.org/10.1007/s12247-023-09729-2>
- Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., & Tamura, G. (1972). Production of Extracellular L-Asparaginases by Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(3), 356–361. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860270>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>
- Banfalvi, G. (2017). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), 306–323. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-13333>
- Burton, G. W., Mogg, T. J., Riley, W. W., & Nickerson, J. G. (2021). α -Carotene oxidation products - Function and safety. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112207. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112207>
- Cardillo, A. B., Rodriguez Talou, J., & Giulietti, A. M. (2009). Recombinant yeast as an alternative biocatalysis system for tropane alkaloids production. *New Biotechnology*, 25,

S132. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06443>

Chapman, K. E., Wilde, E. C., Chapman, F. M., Verma, J. R., Shah, U.-K., Stannard, L. M., Seager, A. L., Tonkin, J. A., Brown, M. R., Doherty, A. T., Johnson, G. E., Doak, S. H., & Jenkins, G. J. S. (2021). Multiple-endpoint in vitro carcinogenicity test in human cell line TK6 distinguishes carcinogens from non-carcinogens and highlights mechanisms of action. *Archives of Toxicology*, 95(1), 321–336. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-029023>

Coyle, J. P., Johnson, C., Jensen, J., Farcas, M., Derk, R., Stueckle, T. A., Kornberg, T. G., Rojanasakul, Y., & Rojanasakul, L. W. (2023). Variation in pentose phosphate pathway-associated metabolism dictates cytotoxicity outcomes determined by tetrazolium reduction assays. *Scientific Reports*, 13(1), 8220. <https://doi.org/10.1038/s41598-023353105>

Crandon, J. L., & Nicolau, D. P. (2012). In Vivo Pharmacodynamic Modeling for Drug Discovery. In *Antibiotic Discovery and Development* (pp. 1035–1054). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_34

de Souza, L. M. D., Ogaki, M. B., Teixeira, E. A. A., de Menezes, G. C. A., Convey, P., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2023). Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1923–1933. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00834-x>

Dimitrova, S., Pavlova, K., Lukanov, L., & Zagorchev, P. (2010). Synthesis of Coenzyme Q10 and β -carotene by Yeasts Isolated from Antarctic Soil and Lichen in Response to Ultraviolet and Visible Radiations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8845-z>

El-Nagga, N. E.-A., El-Ewasy, S. M., & El-Shweihy, N. M. (2014). Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. *International Journal of Pharmacology*, 10(4), 182–199. <https://doi.org/10.3923/ijp.2014.182.199>

Espíndola, M. R., Varotti, F. de P., Aguiar, A. C. C., Andrade, S. N., & Rocha, E. M. M. da. (2022). In vitro assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e18308>

Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., & Smolke, C. D. (2015). Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 349(6252), 1095–1100. <https://doi.org/10.1126/science.aac9373>

Garcia-Hernando, M., Benito-Lopez, F., & Basabe-Desmonts, L. (2020). Advances in Microtechnology for Improved Cytotoxicity Assessment. *Frontiers in Materials*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.582030>

Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>

Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., Swaminathan, S., Khanna, N., Tisminetzky, S., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique

to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-931>

Hamidi, M., Gholipour, A. R., Delattre, C., Sisdighi, F., Mirzaei Seveiri, R., Pasdaran, A., Kheirandish, S., Pierre, G., Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P., & Karimitabar, F. (2020). Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.206>

He, D., Wang, Z., Yang, L., Liu, T., Yao, Y., & Mao, Z. (2016). Modeling and Optimization of the Drug Extraction Production Process. *Scientific Programming*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/3279423>

Hirsch, C., & Schildknecht, S. (2019). In Vitro Research Reproducibility: Keeping Up High Standards. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01484>

Huang, W., Percie du Sert, N., Vollert, J., & Rice, A. S. C. (2019). General Principles of Preclinical Study Design. In *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine* (pp. 55–69). https://doi.org/10.1007/164_2019_277

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Johra, F. T., Bepari, A. K., Bristy, A. T., & Reza, H. M. (2020). A Mechanistic Review of β -Carotene, Lutein, and Zeaxanthin in Eye Health and Disease. *Antioxidants*, 9(11), 1046. <https://doi.org/10.3390/antiox9111046>

Killander, D.; Dohlwitz, A.; Engstedt, L.; Franzén, S.; Gahrton, G., & Gullbring, B. (1976). Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer*, 37:220-8. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197601\)37:1%3C220::AID-CNCR2820370132%3E3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197601)37:1%3C220::AID-CNCR2820370132%3E3.0.CO;2-W)

Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00322>

Kiyama, R. (2017). Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. *European Journal of Pharmacology*, 815, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.049>

Knight, K. L. (2010). Study/Experimental/Research Design: Much More Than Statistics. *Journal of Athletic Training*, 45(1), 98–100. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-45.1.98>

Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>

Kulagina, N., Besseau, S., Godon, C., Goldman, G. H., Papon, N., & Courdavault, V. (2021). Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. *Frontiers in Fungal Biology*, 2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.733492>

Lebozec, K., Jandrot-Perrus, M., Avenard, G., Favre-Bulle, O., & Billiald, P. (2018). Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: A case study prior to pharmaceutical development. *New Biotechnology*, 44, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.04.006>

Lee, J. J. L., Chen, L., Cao, B., & Chen, W. N. (2016). Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 869–877. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-71023>

Li, J., Li, H., Liu, H., & Luo, Y. (2023). Recent Advances in the Biosynthesis of Natural Sugar Substitutes in Yeast. *Journal of Fungi*, 9(9), 907. <https://doi.org/10.3390/jof9090907>

Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3(5), 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015481>

Li, Z., Li, C., Cheng, P., & Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>

Liang, Z., Zhi, H., Fang, Z., & Zhang, P. (2021). Genetic engineering of yeast, filamentous fungi and bacteria for terpene production and applications in food industry. *Food Research International*, 147, 110487. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110487>

Libkind, D., Sommaruga, R., Zagarese, H., & van Broock, M. (2005). Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.005>

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>

Liu, X., Cheng, J., Zhang, G., Ding, W., Duan, L., Yang, J., Kui, L., Cheng, X., Ruan, J., Fan, W., Chen, J., Long, G., Zhao, Y., Cai, J., Wang, W., Ma, Y., Dong, Y., Yang, S., & Jiang, H. (2018). Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nature Communications*, 9(1), 448. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02883-z>

Luan, Y., & Honma, M. (2022). Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability & Disease*, 3(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s42764-021-00058-7>

Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Krishnamoorthy, J., Reshmy, R., Sirohi, R., Pugazhendi, A., Awasthi, M. K., Szakacs, G., & Binod, P. (2021). Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>

Madorran, E., Stožer, A., Arsov, Z., Maver, U., & Rožanc, J. (2022). A Promising Method for the Determination of Cell Viability: The Membrane Potential Cell Viability Assay. *Cells*,

11(15), 2314. <https://doi.org/10.3390/cells11152314>

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Mani, S., & Swargiary, G. (2023). In Vitro Cytotoxicity Analysis: MTT/XTT, Trypan Blue Exclusion. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 267–284). https://doi.org/10.1007/9783-031-19485-6_18

Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>

Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.011>

Martín-Gómez, J., García-Martínez, T., Varo, M. Á., Mérida, J., & Serratos, M. P. (2021). Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts. *LWT*, 146, 111661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111661>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588–611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>

Pan, E., Bogumil, D., Cortessis, V., Yu, S., & Nieva, J. (2020). A Systematic Review of the Efficacy of Preclinical Models of Lung Cancer Drugs. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00591>

Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A.S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Patra, P., Das, M., Kundu, P., & Ghosh, A. (2021). Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances*, 47, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>

Pi, H.-W., Anandharaj, M., Kao, Y.-Y., Lin, Y.-J., Chang, J.-J., & Li, W.-H. (2018). Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous α -carotene and cellulase production. *Scientific Reports*, 8(1), 10850. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29194-z>

Rahmat, E., & Kang, Y. (2020). Yeast metabolic engineering for the production of pharmaceutically important secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4659–4674. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10587-y>

Rani, A., Saini, K., Bast, F., Mehariya, S., Bhatia, S., Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2021). *Microorganisms*: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules*, 26(4), 1142. <https://doi.org/10.3390/molecules26041142>

Raschmanová, H., Weninger, A., Glieder, A., Kovar, K., & Vogl, T. (2018). Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnology Advances*, 36(3), 641–665. <https://doi.org/10.1016/j>

biotechadv.2018.01.006

Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Babu, A. K., Aneesh, E. M., & Pandey, A. (2018). Non-conventional Yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny222>

Rivera Flores, V. K., Fan, X., DeMarsh, T. A., deRiancho, D. L., & Alcaine, S. D. (2023). Leveraging Milk Permeate Fermentation to Produce Lactose-Free, Low-In-Glucose, Galactose-Rich Bioproducts: Optimizations and Applications. *Fermentation*, 9(9), 825. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090825>

Rusinova-Videva, S., Kambourova, M., Alipieva, K., Nachkova, S., & Simova, S. (2019). Metabolic profiling of Antarctic yeasts by proton nuclear magnetic resonance-based spectroscopy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 12–19. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1490201>

Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M. (2016). From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(4), 218–224. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140>

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W., & Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>

Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>

Shahid, M., Nadeem, M., & Bakhat, H. F. (2020). Environmental toxicology and associated human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(32), 39671–39675. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10516-6>

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

Smith, S. M., Wunder, M. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2011). A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time. *PLoS ONE*, 6(11), e26908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026908>

Soler, M. F. de C. R. (2016). Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.97.2016.tde-25022016-093904>

Tabana, Y., Babu, D., Fahlman, R., Siraki, A. G., & Barakat, K. (2023). Target identification of small molecules: an overview of the current applications in drug discovery. *BMC Biotechnology*, 23(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00815-4>

Tadioto, V., Deoti, J. R., Müller, C., de Souza, B. R., Fogolari, O., Purificação, M., Giehl, A., Deoti, L., Lucaroni, A. C., Matsushika, A., Treichel, H., Stambuk, B. U., & Alves Junior, S. L. (2022). Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(8),

1133–1145. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02812-x>

Tadioto, V., Giehl, A., Cadamuro, R. D., Guterres, I. Z., dos Santos, A. A., Bressan, S. K., Werlang, L., Stambuk, B. U., Fongaro, G., Silva, I. T., & Alves, S. L. (2023). Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. *Fermentation*, 9(4), 363. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040363>

Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>

Tanner, L., Haynes, R. K., & Wiesner, L. (2019). An in vitro ADME and in vivo Pharmacokinetic Study of Novel TB-Active Decoquinone Derivatives. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00120>

Tubau-Juni, N., Hontecillas, R., Ehrich, M., Leber, A., Zoccoli-Rodríguez, V., & Bassaganya-Riera, J. (2018). Preclinical Studies: Efficacy and Safety. In *Accelerated Path to Cures* (pp. 25–40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/9783319-73238-1_3

Upreti, S., Pandey, S. C., Bisht, I., & Samant, M. (2022). Evaluation of the target-specific therapeutic potential of herbal compounds for the treatment of cancer. *Molecular Diversity*, 26(3), 1823–1835. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10271-x>

Vajrabhaya, L., & Korsuwannawong, S. (2018). Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0146-0>

Van den Bossche, S., Vandeplassche, E., Ostyn, L., Coenye, T., & Crabbé, A. (2020). Bacterial Interference With Lactate Dehydrogenase Assay Leads to an Underestimation of Cytotoxicity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00494>

Vaz, A. B. M., Rosa, L. H., Vieira, M. L. A., Garcia, V. de, Brandão, L. R., Teixeira, L. C. R. S., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., & Rosa, C. A. (2011). The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 937–947. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>

Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Quental, M. V., Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2017). Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chemical Reviews*, 117(10), 6984–7052. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00550>

Vieira, E. F., Carvalho, J., Pinto, E., Cunha, S., Almeida, A. A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.006>

Wagner, J. M., & Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>

Walker, G. M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other

yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>

Worland, A. M., Czajka, J. J., Li, Y., Wang, Y., Tang, Y. J., & Su, W. W. (2020). Biosynthesis of terpene compounds using the non-model yeast *Yarrowia lipolytica*: grand challenges and a few perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.020>

Zhuang, Y., Yang, G.Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Deng, Z., & Feng, Y. (2017). Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme. *Metabolic Engineering*, 42, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jymben.2017.04.009>

Zucconi, L., Canini, F., Temporiti, M. E., & Tosi, S. (2020). Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 6459. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186459>