



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**OCORRÊNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DO CERRADO**

MARCOS DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. HELSON MARIO MARTINS DO VALE

Dissertação de mestrado

BRASÍLIA, JULHO/2015



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**OCORRÊNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DO CERRADO**

MARCOS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. HELSON MARIO MARTINS DO VALE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação da
Universidade de Brasília como
parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Biologia Microbiana.

BRASÍLIA, JULHO/2015



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**OCORRÊNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DO CERRADO**

APROVADA PELA BANCA EM 24 DE JULHO DE 2015:

PROF. DR. HELSON MARIO MARTINS DO VALE – ORIENTADOR

PROFA. DRA. ELIANA DOS SANTOS LEANDRO – DEPARTAMENTO DE
NUTRIÇÃO - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROFA. DRA. MARIANA RODRIGUES FONTENELLE - EMBRAPA
HORTALIÇAS - CNPH

BRASÍLIA, JULHO/2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter permitido chegar até este momento e ao meu anjo de guarda que tem trabalhado muito durante essas minhas longas viagens para Brasília.

Gratidão a minha mãe Dona Dilene que lutou muito para me dar aquilo que realmente é necessário na vida de um verdadeiro homem. Minha esposa que é o pilar dos meus sucessos. Aos meus filhos que tiveram paciência e amor ao dividir seu pai com as longas noites de pesquisa e viagens intermináveis.

Ao meu orientador Prof^o Helson por ser um verdadeiro mestre ensinando a ser um profissional melhor e por ter me acolhido de todas as maneiras possíveis em Brasília, sempre terei admiração e respeito a este professor.

As minhas novas amigas de trabalho da UNB: Geisy (escrevi assim pois seu nome é muito difícil) uma fonte de sabedoria, de conforto e amizade sendo uma “Co-orientadora” de primeira qualidade. A Catharine, Flavia, Carol, Erica, Willian, Nancy por deixar os dias no laboratório mais descontraídos, pela amizade e acolhimento e, Brasília.

Ao meu amigo Reinaldo Scaramelo por ser um incentivador e regador deste sonho deste os tempos da escola estadual.

Ao IFNMG-Campus Arinos pela amizade dos professores e técnicos que me deram força para não desistir na caminhada.

Ao IFNMG- Campus Salinas por me ajudar nos horários para não atrapalhar o andamento dos trabalhos. A técnica em química Eliane por ter feito as diluições para testes enzimáticos sendo sempre atenciosa em todos os momentos.

Aos meus amigos de Faculdade Juliano Nogueira, Marcelo Mendes e Leonardo por serem aqueles que plantaram a semente da pesquisa e ter feito o desafio do mestrado.

A professora Marisa (UNB) pelas palavras de conforto em momentos que as vezes duvidamos da nossa própria capacidade e ao professor Juvenil (UNB) pelo exemplo de profissional, doçura e simpatia compartilhada comigo nos corredores da UNB.

A Universidade de Brasília por me honrar em ser seu discente.

A Luciana Medeiros pela atenção sempre demonstrada e carinho em seu atendimento na secretaria da Pós-graduação em Biologia Microbiana.

DEDICATÓRIA

Dedico este título a minha mãe Dilene Celeste, a minha esposa Maria da Penha e filhos Mateus e Lucas e todos aqueles que não tiveram oportunidade de bater na porta mas foram obrigado a derruba-lá para ter seu lugar ao sol.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.”

Salmos 37:3-5

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 - CERRADO	13
2.2 - FRUTOS DO CERRADO	14
2.3 - FUNGOS ASSOCIADOS A PLANTAS	16
2.4 - LEVEDURAS	18
2.5 - ENZIMAS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS	19
2.6 - TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A DIVERSIDADE DE LEVEDURAS	21
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4.1 - LOCAL, FRUTOS E COLETA.....	26
4.2- ISOLAMENTO DE LEVEDURAS EM MEIO DE CULTURA	29
4.3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	30
4.4 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS POR DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO DE REGIÕES DE MICROSATÉLITES.....	31
4.5 - PCR E SEQUENCIAMENTO DO DOMÍNIO D1/D2 DO rDNA.....	32
4.6 - ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	33
4.7 - CAPACIDADE DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	33
5.1 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS	35
5.2-CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRUPAMENTO POR DENDOGRAMA.....	38
5.3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS.....	41
5.4 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO	44

5.5 - RESULTADOS DOS TESTES ENZIMÁTICOS.....	52
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REGIÕES CODIFICADORAS DO rDNA.....	24
FIGURA 2: LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE ARINOS.....	27
FIGURA 3: FRUTOS COLHIDOS PARA ANÁLISE	28
FIGURA 4: METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS EM FRUTOS DO CERRADO.....	30
FIGURA 5: TESTES ENZIMÁTICOS.	34
FIGURA 6 : DENDOGRAMA DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA	40
FIGURA 7: DENDOGRAMA DE SIMILARIDADE DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DOS FRUTOS DO CERRADO.....	42
FIGURA 8: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS BASIDIOMICÉTICAS	44
FIGURA 9: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS ASCOMICÉTICAS.	45
FIGURA 10: PORCENTAGEM DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE FRUTOS DO CERRADO PRODUTORES DAS ENZIMAS AMILASE CELULASE, PROTEASE E PECTINASE.....	56

TABELAS

TABELA 1: VALOR ENERGÉTICO, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE FRUTOS DO CERRADO EM 100 G.....	15
TABELA 2: FRUTO HOSPEDEIRO, LOCALIZAÇÃO, COORDENADAS GEOGRÁFICAS E DATAS DE COLETAS.....	27
TABELA 3: CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR GRAMA DE FRUTO (UFC/g).	35
TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS POR FRUTO HOSPEDEIRO	37
TABELA 5: RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DES LEVEDURAS EM FRUTOS DO CERRADO PELO PAREAMENTO COM O BANCO DE DADOS GENE BANK.....	50
TABELA 6: RESULTADOS DE TESTES ENZIMÁTICOS DE ISOLADOS DOS FRUTOS DO CERRADO.....	53

ANEXOS

ANEXO 1: TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA TESTES ENZIMÁTICOS	71
ANEXO 2: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE PEQUI.	71
ANEXO 3: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE COCO GUARIROBA.	72
ANEXO 4: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE CAGAITA E CAJU..	72
ANEXO 5: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE MANGABA.	73
ANEXO 6: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE ARATICUM.....	73
ANEXO 7: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE COQUINHO AZEDO..	74
ANEXO 8: PERFIS ELETROFORÉTICOS BASEADOS EM FRAGMENTOS DE DNA DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE ARAÇÁ	74

Oliveira, Marcos de. **Ocorrência, diversidade e caracterização enzimática de leveduras isoladas de frutos do cerrado.** Mestrado acadêmico em Biologia Microbiana do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. Sob a orientação do Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale.

RESUMO

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, guardando um grande potencial microbiológico. Sua vegetação endêmica é rica em frutos que muitas vezes são desconhecidos dentro da própria população brasileira. Frutos como araticum, pequi, mangaba, coquinho, buriti são alguns exemplos destes frutos ricos em nutrientes, principalmente carboidratos e lipídios. Devido essas características químicas e o ambiente onde residem os frutos promovem um cenário ideal para o desenvolvimento de leveduras. É importante conhecer estes micro-organismos, pois podem produzir várias substâncias com potencial biotecnológico nas áreas da produção agrícola, saúde, indústrias e alimentícios. O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de leveduras em frutos do cerrado, fazer a caracterização molecular e enzimática destes isolados. Foram coletados 13 frutos do cerrado: pequi, mangaba, caju do cerrado, cagaita, pitomba, coco guariroba, araçá, jatobá do cerrado, maracujá do cerrado, lobeira, buriti, araticum e coquinho azedo sendo isoladas 85 leveduras. A caracterização genética dos isolados foram feitas por meio de técnica de MSP-PCR e posteriormente agrupadas pelo programa Bionumerics® por similaridades de seus perfis eletroforéticos. Para a identificação dos isolados foi realizado o sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S. Foram encontrados 14 gêneros: *Candida*, *Meyerozyma*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Lodderomyces*, *Eremothecium*, *Bandoniozyma*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Pseudozyma* e *Cryptococcus*. Os testes enzimáticos com amilase, pectinase, celulase e protease mostraram que 54 isolados produziram algum tipo dessas enzimas e 25 apresentaram no mínimo duas. As enzimas mais produzidas pelos isolados foram protease com aproximadamente 35%, seguida de celulase com 23%, pectinase com 16% e amilase com 13%.

Palavras chaves: Ecologia de leveduras, região D1/D2 do gene 26S, sequenciamento, enzimas.

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest biome in Brazil, keeping a large microbiological potential. Its endemic vegetation is rich in fruits that are often unknown within the Brazilian population. Fruits like araticum, pequi, mangaba, coconuts, buriti are some examples of these fruits rich in nutrients, especially carbohydrates and lipids. Because of these chemical characteristics and the environment in which the fruits reside promote an ideal setting for the growth of yeasts. It is important to know these microorganisms as they can produce various substances with biotechnological potential in the areas of agriculture, health and food industries. The objective of this work was to study the occurrence of yeasts in fruits of the cerrado, make the molecular and enzymatic characterization of isolates. Were collected 13 fruits of the cerrado: pequi, mangaba, caju the cerrado, cagaita, pitomba, guariroba coconut, araçá, jatoba the cerrado, maracujá the cerrado, lobeira, buriti, araticum and sour coquinho being isolated 85 yeasts. Genetic characterization of the isolates were made by MSP-PCR and subsequently grouped by Bionumerics® program for similarities of their electrophoretic profiles. For the identification of the isolates was carried region sequencing the D1 / D2 26S gene. 14 genera were found: *Candida*, *Meyerozyma*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Lodderomyces*, *Eremothecium*, *Bandoniozyma*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*, *Rhodospordium*, *Pseudozyma* and *Cryptococcus*. Enzymes tested amylase, pectinase, cellulase and protease showed that 54 isolates produced some type of these enzymes and 25 had at least two. The enzymes produced by the isolates were more protease about 35%, then 23% of cellulase, pectinase and amylase with 16% to 13%.

Keywords: Yeast ecology, region D1/D2 26S gene sequencing and enzymes.

1- INTRODUÇÃO

O Cerrado está entre os principais biomas mundiais guardando uma grande variedade de animais e plantas endêmicas. Dentro deste conjunto de diversidade estão os frutos que já começam a chamar a atenção de muitas indústrias de cosméticos e de alimentos devido ao seu grande valor nutricional e de sua composição química.

As leveduras sempre tiveram papéis vitais para a manutenção de energia e reciclagem de substâncias em nosso planeta. Estes seres vivos podem ser encontrados em todos os lugares desde ambientes inóspitos, como águas geladas na Patagônia, regiões vulcânicas ou simplesmente associados a seres vivos.

Dentro dessa perspectiva, os frutos do cerrado são excelentes fontes destes micro-organismos. Eles dispõem de boas condições para o crescimento de leveduras visto que os frutos possuem características ideais de pH, vivem em ambiente cuja temperatura média é de 25°C a 30°C e possuem vários tipos de carboidratos como fonte de energia.

Com a evolução da tecnologia, principalmente com a facilidade de acesso às técnicas moleculares, cresceu exponencialmente o interesse em estudar micro-organismos, principalmente as leveduras. As técnicas moleculares, principalmente da PCR e sequenciamento, trabalhadas em conjunto com as técnicas tradicionais de cultivo, podemos identificar leveduras em frutos com bastante sucesso.

Uma das características de grande interesse nesses micro-organismos é a produção de enzimas extracelulares que podem ser produzidas em grande escala e com segurança, visto que a maior parte de leveduras contidas em frutos não são patogênicas. Muitas destas enzimas já fazem parte do nosso cotidiano, em bebidas fermentadas e destiladas, no uso de detergentes menos nocivos ao meio ambiente, medicamentos,

produção de papéis e várias outras aplicações. Quanto mais conhecemos as leveduras mais aumentamos as possibilidades de exploração.

O fato de as leveduras em frutos metabolizarem vários tipos de substratos as torna uma fonte promissora de enzimas. As enzimas celulase, protease, amilase e pectinase estão entre as mais procuradas no mercado devido sua grande aplicação em vários ramos das industriais.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - CERRADO

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil estando abaixo somente da Floresta Amazônica (KLINK; MACHADO, 2005). Ocupa uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional, onde estão inclusos os Estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí e o Distrito Federal (MMA, 2015). O cerrado pode ser classificado em vários tipos de formações predominantes: cerrado, cerradão, campo sujo, campo limpo, veredas e mata de galeria (RIBEIRO, 2008). O clima pode ser considerado como tropical com um índice pluviométrico anual de 1500 mm. De outubro a março ocorre período chuvoso e nos demais meses do ano ocorre o período de estiagem. As temperaturas médias são de 22°C no sul e 27°C ao norte (DJALMA, 2001).

O cerrado está na lista de *hotspots* mundiais de biodiversidade, apresenta extrema abundância de espécies endêmicas. Este notável bioma abriga 11.627 espécies de plantas nativas, 199 espécies de mamíferos, uma rica avifauna com cerca de 837 espécies catalogadas, peixes 1.200 espécies, répteis 180 espécies e anfíbios 150 espécies (MMA, 2015).

Sua flora apresenta grande diversidade por acolher muitos ambientes dentro do próprio bioma onde se tem uma estimativa de 44% de flora endêmica (KLINK; MACHADO, 2005), com gramíneas, arbustos e árvores espalhadas. Suas árvores têm caules retorcidos e raízes longas, que permitem a absorção da água disponível nos solos do cerrado abaixo de 2 metros de profundidade, mesmo durante a estação seca do inverno (GOLDSTEIN, 2008).

Devido à ação da agropecuária uma grande parte da sua cobertura vegetal original já foi devastada promovendo uma rápida degradação do solo (DURIGAN *et al.*, 2004). Algumas estimativas chegam a apontar que este bioma já perdeu até 2008, 47,84% dos 204 milhões de hectares de sua cobertura vegetal original (MMA, 2015). 8,1% do Cerrado estão protegidos por Unidades de Conservação sendo 3,1% de Proteção Integral e 5% de uso sustentável (MMA, 2015).

2.2 - FRUTOS DO CERRADO

Os frutos do cerrado vêm, gradativamente, chamando a atenção dos consumidores brasileiros. Frutos desconhecidos para a grande maioria da população sendo explorados apenas por pequenos grupos de agricultores regionais. Hoje, estes frutos vêm despertando a atenção de indústrias de cosméticos, graças a seu grande potencial para a fabricação de óleos, cremes e xampus. Na alimentação, o consumo ainda tem uma exploração muito tímida e de maneira extrativista e às vezes predatória, sendo comercializada em feiras regionais nas cidades onde são encontrados (FRANZON, 2009). A utilização de novas metodologias e maior divulgação destes frutos pode viabilizar o desenvolvimento sustentável da agricultura familiar virando renda para as pequenas comunidades rurais, com isso pode incentivar a produção e atingir um maior público consumidor (CAMPOS, 2012).

Algumas iniciativas de organizações como a COPABASE, localizada no noroeste de Minas Gerais, na cidade de Arinos, formada por agricultores familiares extrativistas produzem várias linhas alimentares à base de produtos do cerrado, principalmente frutos, e como filosofia principal o respeito ao meio ambiente. Essas

ações vêm aumentando o interesse desses produtos chamando atenção para o grande potencial de exportação divulgando também os frutos dentro do Brasil.

Os frutos do cerrado são alimentos ricos em vários componentes nutricionais, como vitaminas, glicídios, lipídios como mostrado na Tabela 1. Estes dados são obtidos a partir de 100 gramas de polpa do fruto. As informações são baseadas em várias pesquisas sendo que muitos destes resultados podem variar um pouco, por causa de diferentes metodologias empregadas (SILVA 2008; ROCHA 2011 e FUJITA 2012).

Tabela 1: Valor energético, características físico-químicas de frutos do cerrado em 100 g. (Fonte: SILVA 2008; ROCHA 2011, 2012 e FUJITA 2012).

Fruto	Valor energético em Kcal	Umidade %	Proteínas %	Lipídios %	Carboidratos %
araçá	37,09	82,36	0,5	0,49	7,67
araticum	90,47	76,05	1,22	3,83	12,78
buriti	14,3	72,8	3	10,5	12,5
cagaíta	20,01	94,34	0,82	0,44	3,08
caju do cerrado	38,27	86,57	1,18	0,63	6,97
coquinho azedo	52,56	89,8	0,57	6,27	2,8
coco guariroba	47,36	87,31	0,5	0,12	10,57
jatobá do cerrado	33,78	12	1,7	0,03	10,8
lobeira	34,5	11,16	0,6	0,07	84,99
mangaba	66,21	82,4	1,2	2,37	10,02
maracujá do cerrado	24,4	85,5	2,1	0,03	10,8
pequi	35,84	41,5	3	33,9	11,45
pitomba	56,35	83,16	1,15	0,19	12,51

Uma boa justificativa para explorar os frutos do cerrado é que muitos ainda se encontram na forma natural, sem sofrer interferências humanas como melhoramentos morfológicos ou genéticos tornando-se uma fonte riquíssima para os pesquisadores, principalmente em áreas microbiológicas e enzimáticas. Com pesquisas e estudos podemos descobrir uma grande variedade de possibilidades e aplicações destes micro-organismos nas áreas da saúde, industriais e biotecnologia (CHANDRA 2012; WANG 2011).

2.3 - FUNGOS ASSOCIADOS A PLANTAS

A presença de micro-organismos em plantas sempre foi associada à ideia de alguma patogenicidade. O primeiro que descobriu que nem todos os micro-organismos existentes são prejudiciais foi BARY (1866). A partir de então, foram descobertas outras associações benéficas com outros tipos de micro-organismos, principalmente fungos. Estes podem ser encontrados em todos os órgãos das plantas. GALVÃO (2014) encontrou leveduras em raízes de plantas do Pantanal Mato-grossense e SILVA (2014) fungos associados a substratos de plantas da caatinga. Em espécies do cerrado estudos como de CASTRO (2015) em ramos e folhas *Copaifera langsdorffii* (copaíba) verificaram a presença de oitos tipos de fungos. A associação de culturas com fungos vem despertando interesse de agricultores. Em um experimento com feijão-caupi em solos do cerrado verificou que a inoculação do feijão com rizóbio e *Trichoderma spp* foram de grande importância para a produção de biomassa, nodulação, proteção contra patógenos e consequentemente o aumento da produção de grãos (JÚNIOR, 2014).

Fungos podem ser classificados conforme sua região de colonização em epifíticos, quando estão localizados na região exterior de órgãos e tecidos de plantas, e endofíticos, quando estão localizados dentro do vegetal. PETRINI (1991) diz que endofíticos, são micro-organismos capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais em algum período do ciclo de vida. ROMANTSCHUK (1992) diz que micro-organismos epifíticos são mais adaptados ao ambiente exterior dos vegetais e com maior dificuldade de serem removidas em lavagens, visto que sua permanência neste local é uma vantagem seletiva ao ambiente. Esse tipo de classificação é puramente didática, pois conforme as condições do habitat (luz, radiação, temperatura e oferta de substratos energéticos) pode haver migração de localização e causar diferenças sazonais em suas populações (LEBBEN, 1998, INÁCIO, 2005).

A superfície das plantas é rica em substratos, sendo encontrados vários tipos de micro-organismos, principalmente fungos (ANDREWS & HARRIS, 2000). BARATA (2012) faz um levantamento de micro-organismos em superfície de uva e a relação de população de acordo com o estado físico (frutos em perfeito estado e frutos com lesões mecânicas) sendo este fator a causa de mudança de ecologia de populações de leveduras.

Os fungos chamados de endofíticos mostram que essa interação se torna cada vez mais importante nos ciclos das plantas, pois libera componentes que protegem a planta contra invasores e patógenos e auxiliam na captação de recursos minerais (ASCHEHOUG, 2012). Estes micro-organismos entram em contato com as plantas podendo ocorrer a colonização através dos estômatos das folhas, lenticelas, pêlos absorventes e radículas em germinação. Podem ser transportados para dentro das plantas através de injúrias causadas por choques mecânicos, picadas de insetos ou ações de pássaros.

Os frutos também são considerados como um excelente habitat de vários micro-organismos, principalmente leveduras, graças a sua constituição química muitas vezes rica em fontes energéticas como carboidratos e lipídios, baixo pH e constante visitaçã de insetos.

A devastação ocorrida pela ação antrópica desordenada (DINIZ, 2009) pode levar à extinção muitas espécies de plantas e mudar as características naturais do ambiente. Com a perda de espécies vegetais consequentemente perderemos o acesso a uma grande quantidade de micro-organismos associados que nunca foram catalogados pelos microbiologistas.

2.4 - LEVEDURAS

As leveduras estão em um grupo diverso, pertencente ao domínio Eukarya, reino Fungi. Segundo KURTZMAN (2011) cerca de 1500 espécies foram catalogadas em 2011. Podem ser encontradas em vários tipos de ambientes e substratos como: águas geladas da Patagônia (LIBKIND, 2003), solos impactados por mineração (MOREIRA, 2015), plantas (AMPRAYN, 2012) e insetos (VALENTE, 2012). São divididos, predominantemente, em dois grandes grupos: Filo Ascomycota - possuindo como característica esporos dentro de ascos e o Filo do Basidiomycota - no qual a produção de esporo é externa em basídios.

Leveduras basidiomicéticas são mais frequentemente encontradas em filoplano pois tem maior capacidade de absorção de outras fontes de carbono (KUTZMAN e FEEL, 1998). Representantes de basidiomicetos possuem características de possuírem pigmentos carotenóides que protegem da exposição direta a luz solar (ATLAS e BARTHA, 1997) e cápsulas polissacarídicas que protegem contra condições adversas de ressecamento e baixa umidade (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 2003). Leveduras ascomicéticas são encontradas com mais frequência em ambientes ricos de açúcares mais simples, suas colônias apresentam geralmente cores brancas ou bege e são também encontradas em insetos polinizadores de frutos (SANTOS, 1996).

As leveduras crescem e reproduzem-se rapidamente por gemulação ou brotamento por causa da sua maior relação área/volume, possuem parede celular rígida por causa da presença de quitina, característica marcante entre os fungos. Elas podem ser anaeróbias ou aeróbias. Em geral, desenvolvem-se melhor em condições ácidas com pH entre 4,5 e 5,0 numa temperatura ótima de 20°C a 30°C. Seu principal combustível

energético vem da degradação de carboidratos, principalmente o açúcar, sendo este substrato essencial para selecionar a comunidade de leveduras de um determinado ambiente.

Os frutos do cerrado são colonizados por uma rica diversidade de leveduras (SPERANDIO, 2012 e ARAÚJO, 2015) isso se dá por influência causada pelas condições de seus solos com baixo pH e a sua composição química (RESENDE, 1995). Por essas características podemos encontrar hospedando estes frutos vários grupos de leveduras sendo, atualmente, fonte de descoberta de novas espécies. Vários trabalhos vêm utilizando frutos como fonte de leveduras. SILVA (2013) descreveu a ocorrência de leveduras por causa da presença de nutrientes no filoplano de pequizeiros. TOURNAS (2006), em estudos de saladas de frutas em supermercados nos Estados Unidos, na cidade Washington, encontraram espécies de leveduras *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* e *Saccharomyces*. SPERANDIO (2012) isolou de folhas e frutos do cerrado 322 leveduras nas quais 39 são endofíticas. ARAUJO (2015) isolou 9 leveduras de frutos do cerrado do ingá, guavira e pinha e testou sua capacidade para produção enzimática.

2. 5 - ENZIMAS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS

Alguns estudos procuram conhecer a diversidade e isolar leveduras ambientais para aplicações biotecnológicas devido a sua grande capacidade de desenvolverem-se em vários tipos de substratos e produzirem enzimas extracelularmente e, como a maioria associado ao fruto não é patogênica, não causa prejuízo a saúde humana. Com os avanços tecnológicos na engenharia genética se torna uma ferramenta de fácil manipulação gênica e de rápida reprodução facilitando a produção enzimática em grande escala (STEELE e STOWER, 1991). Enzimas como pectinases, amilases,

proteases, celulasas estão entre as enzimas de grande interesse para vários ramos industriais. As amilases são amplamente utilizadas nas indústrias alimentícias, pois na dissolução da molécula de amido tem como produtos, açúcares, CO₂ e álcool, muito utilizados na produção de bebidas fermentadas e na indústria panificadora. Destaca-se por estar entre as mais importantes enzimas na produção de produtos alimentícios industrializados. Segundo SAXENA (2007), cerca de 25% das enzimas comercializadas são amilases. As amilases podem ser classificadas em três grandes grupos: as alfa-amilases, também conhecidas com endoamilases por agirem no interior da cadeia do amido, beta-amilase agem nas extremidades e as glicoamilases que liberam monômeros de glicose do terminal não redutor do amido (GUPTA, 2003).

Trabalhos de COSTA (2014) mostraram que leveduras isoladas de batata-doce tiveram grande capacidade de produzir amilases na degradação de amido solúvel, amido de milho e amido de mandioca. Outro trabalho, de LANDELL (2009), isolou 174 leveduras do filoplano de bromélias sendo que 40,2% tiveram capacidade aminolítica. LOTTERMANN (2012) vem utilizando enzimas aminolíticas isoladas de *Cryptococcus flavus* e posteriormente expressando em *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol utilizando o amido como substrato.

Outra enzima muito importante é a pectinase, muito utilizada nas indústrias de bebidas, no processo de clarificação de sucos, melhorando o aspecto da viscosidade e turbidez (OLIVEIRA, 2015). Algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyvermyces marxianus*, *K. lactis* e *Candida utilis* são utilizadas na clarificação de sucos de frutas e vinhos, pois só produzem a enzima poligalacturonase que não produz o metanol, nocivo a saúde humana (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, 2004). Pectinases também são utilizadas para diminuir o sabor amargo de cascas de citrus, manter o aroma

perdido durante o processo de secagem e melhorar a consistência de frutos e vegetais processados (UENOJO, 2007).

As celulasas são enzimas que agem nas celulosas, carboidratos estruturais pertencentes a parede celular. Elas podem ser classificadas em exoglucanases, que atuam na região externa da celulose, as endoglucanases tem a capacidade de hidrolisar as regiões internas e as celobiasas ou β -glicosidases que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO, 2010). São utilizadas em várias áreas industriais como na produção de papel, de alimentos, indústrias têxtil, farmacêutica entre outras aplicações. A utilização dessas enzimas reduz o tempo do processo industrial, são mais baratas, melhoram a qualidade do produto final e, por fim, geram menor impacto ao meio ambiente (MAYRINK, 2010 e KUHAD, 2011).

Outro tipo de enzima, também de grande importância e muito pesquisada em leveduras é a protease. Enzima proteolítica que quebra ligações peptídicas em proteínas tendo muita importância para processos metabólicos e fisiológicos de todos os seres vivos (RAO, 1998). Este tipo de enzima é amplamente utilizado em vários ramos das indústrias: produção de detergentes, na alimentação (NEVES, 2006). YANG, (2013) utilizou proteases em tratamento de águas residuais minimizando os efeitos dos seus dejetos no meio ambiente.

2.6 - TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A DIVERSIDADE DE LEVEDURAS

As técnicas tradicionais de cultivo são importantes e têm norteado as pesquisas no campo da microbiologia por muitos anos. Elas se baseiam em características fenotípicas, químicas e fisiológicas. Porém, essas informações podem receber influências do meio externo, como tipo de substrato no meio de cultivo, condições

aeróbicas, pressão, temperatura. Esses fatores podem alterar características originais dificultando a identificação verdadeira do isolado. Também há um grande problema em conseguir reproduzir as condições necessárias para o crescimento em laboratório, visto a grande variabilidade de espécies de leveduras e por isso restringe a descoberta de muitos micro-organismos (NAVARRETE, 2009). Com a evolução das técnicas moleculares, permitiu a possibilidade de chegar a identificação mais precisa e rápida de espécies por análise do seu material genético.

Uma grande ferramenta usada é a técnica de reação de cadeia da polimerase, a PCR. Por meio de uma pequena porção de DNA do isolado podemos amplificar sequências de interesse em milhões de cópias (KONEMAM, 2001). Seus resultados possuem um maior poder de verificação da identidade microbiológica em menor tempo e conseguem detectar micro-organismos que não são normalmente cultiváveis em meios tradicionais (BUSH e NITSCHKO, 1999).

Para estudos de diversidade de leveduras pode ser usada a amplificação do DNA por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos “Microsatellite-Primed” ou MSP-PCR. Essa técnica consiste na utilização de um conjunto de marcadores microssatélites que funcionam como iniciadores de PCR flanqueados por sequências repetidas. Sua amplificação é baseada em regiões repetitivas em *tandem* (MEYER E MITCHELL, 1995). Por ser um marcador codominante e multialélico é considerado bem informativo. As escolhas dos *primers* ou iniciadores são decisivas para a boa reprodutibilidade da PCR. Os mais usados são (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₅ e devido à grande capacidade de detecção de polimorfismos podendo ser usado para uma grande gama de organismos (BASILIO, 2008). Os resultados irão gerar uma “digital” de cada isolado que recebe o nome de *fingerprint*, revelando diferentes padrões de bandeamento específicos de cada espécie.

Trabalhos desenvolvidos por SPERANDIO (2012) com leveduras de frutos do cerrado demonstraram que esta metodologia MSP-PCR produz resultados rápidos. Outro exemplo de aplicação dessa metodologia foi o estudo de leveduras nos lagos da Patagônia, colaborando com a descoberta da diversidade de leveduras deste ambiente levando a 90% da identificação de seus isolados (LIBKIND, 2003). RAMIREZ CASTRILLÓN (2013) conseguiu discriminar diversidade de leveduras associada a vinhos na região sul do Brasil. Para fazer a identificação de espécies de leveduras é muito utilizado o DNA ribossomal (rDNA), pois apresenta partes codificantes e não codificantes. Outro fator importante desta escolha é que o ribossomo está presente em todos os seres eucariotos, respeitando a origem monofilética (VALENTE, 1999). O rDNA está organizado em agrupamentos na disposição 5'-3' conforme a Figura 1. O gene 18S- região espaçadora externa (ETS), gene 5.8S- região espaçadora interna (ITS1), 5S – região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Para estudo de análise de filogenia taxonômica é utilizado a região D1/D2 presente no gene 26S do rDNA (Figura 1) por apresentar regiões mais conservadas conseguindo somente essa região identificar grande gama das leveduras (HAMAMOTO, 2002 e KURTZMAN & ROBENETT, 1998). A região ITS 1 e ITS 2 são menos conservadas sendo usada para diferenciar espécies mais relacionadas.

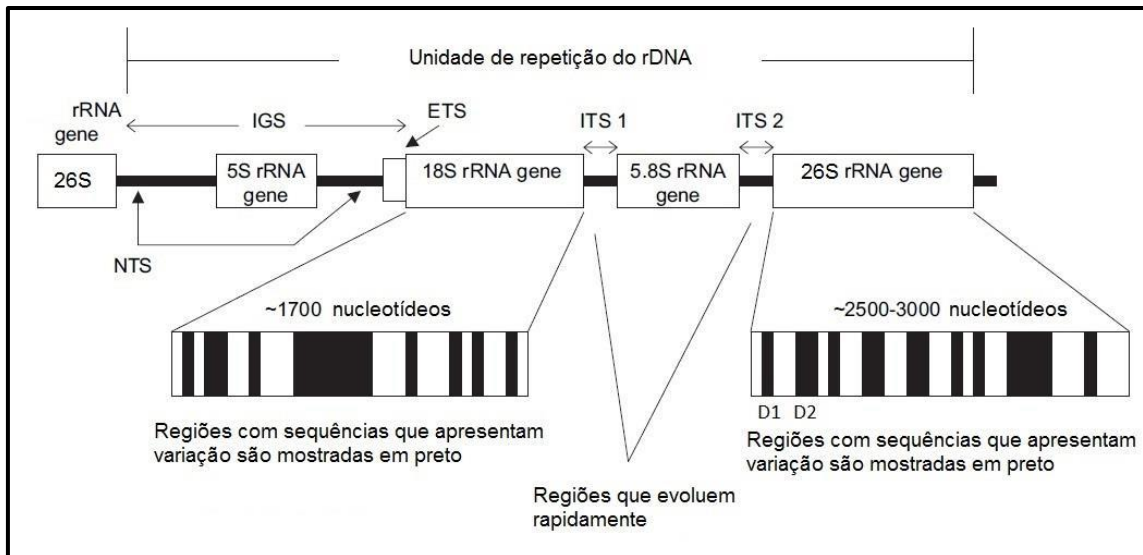


Figura 1: Regiões codificadoras do rDNA- Fonte: MITCHELL E ZUCARO, (2006).

Amostras da mesma espécie apresentam, no máximo, três nucleotídeos diferentes (0-0,05%), enquanto aquelas que apresentarem seis ou mais substituições em bases nucleotídicas (1%) são consideradas espécies diferentes (KURTZMAN e FELL, 2006). A região D1/D2 já possui muitos exemplares sequenciados e suas sequências depositados em bancos de dados disponíveis na internet, como o Genbank e MycoBank servindo como referência de comparação para fazer identificação e também permitindo a descoberta de novas espécies (FELL, 2000, KURTZMAN e ROBNETT, 1998).

Essa abordagem está mudando conceitos na taxonomia de leveduras. Por causa das informações baseadas no DNA estão ocorrendo novas propostas de classificações em vários níveis taxonômicos, reclassificação de espécies e descobertas de novas espécies (CANHOS, 2001). Trabalhos como de FELL (2000) mostram a necessidade de remanejamento de leveduras basidiomicéticas distribuídas entre as três principais linhas filogenéticas do filo Basidiomycota após analisar o resultado das sequências D1/D2. Podemos usar como exemplo o trabalho de JINDAMORAKOT (2004), que conseguiu identificar três novas espécies do gênero de *Candida* a partir do gênero *Pichia*. Estudos de VALENTE (2012) após a confirmação de diferenças entre nucleotídeos em D1/D2

propôs a criação de um novo gênero *Bandoniozyma* sendo que estas espécies faziam parte, anteriormente, do gênero *Bulleromyces*.

3- OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência e a diversidade de leveduras em frutos nativos do cerrado e o potencial destes isolados na produção de enzimas proteases, amilases, pectinases e celulases.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ocorrência e contagem de leveduras em frutos do cerrado por meio de técnicas tradicionais de cultivo.
- Analisar a diversidade de leveduras por meio de técnica molecular de MSP/PCR.
- Identificar isolados utilizando do sequenciamento do gene 26S rDNA,
- Testar a capacidade de leveduras isoladas em produzir enzimas proteases, amilases, pectinases e celulases.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - LOCAL, FRUTOS E COLETA

Os frutos foram colhidos no município de Arinos (Figura 2) e regiões adjacentes cuja sua localização compreende de 15° 55' 01" S longitude: 46° 06' 20" W latitude, altitude: 509 m e área: 5338,5 Km² situado na região do Noroeste de Minas Gerais. Este município está totalmente inserido no cerrado brasileiro. As amostras foram coletadas no período de março a agosto de 2014. Alguns dos frutos usados no estudo foram cedidas pela COPABASE (Cooperativa de Agricultura Familiar Sustentável com Base na Economia Solidária) sendo araticum (*Annona crassiflora*), mangaba (*Hancornia speciosa*) e pequi (*Caryocar brasiliense*). Outras fontes de coleta não foram descartadas visto que nem todos os frutos de interesse no trabalho estavam disponíveis pela cooperativa. Os frutos cagaita (*Eugenia dysenterica*), caju do cerrado (*Anacardium humile*) e araçá (*Psidium cattleianum*), foram cedidas por moradores da cidade e recolhidos em seus próprios quintais. Os frutos pitomba (*Talisia esculenta*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), coquinho azedo (*Butia capitata*), jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*), buriti (*Mauritia flexuosa*) em distritos pertencentes a cidade, como Vila Bom Jesus a 56 km de distância da cidade. O maracujá do cerrado (*Passiflora cincinnata*) e coco guariroba (*Syagrus oleracea*) em outro distrito da cidade chamado Morrinhos localizados a 33 km. As coletas respeitaram o calendário de produção dos frutos já que eles amadurecem em épocas diferentes no decorrer do ano. A Tabela 2 mostra as coordenadas e locais onde foram colhidos os frutos hospedeiros com suas respectivas datas de coletas.

Tabela 2: Fruto hospedeiro, localização, coordenadas geográficas e datas de coletas.

Fruto Hospedeiro	Localidade	Coordenadas Geográficas	Data da coleta
araticum	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	14/03/2014
mangaba	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	14/03/2014
pequi	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	15/03/2014
cagaita	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	12/10/2014
caju do cerrado	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	08/08/2014
araçá	Cidade Arinos	15° 55' 01" S e 46° 6' 20" W	28/03/2014
pitomba	Distrito Vila Bom Jesus	15° 51' 20" S e 45° 43' 52" W	16/03/2014
lobeira	Distrito Vila Bom Jesus	15° 51' 20" S e 45° 43' 52" W	09/06/2014
coquinho azedo	Distrito Vila Bom Jesus	15° 51' 20" S e 45° 43' 52" W	16/03/2014
jatobá do cerrado	Distrito Vila Bom Jesus	15° 51' 20" S e 45° 43' 52" W	14/08/2014
buriti	Distrito Vila Bom Jesus	15° 51' 20" S e 45° 43' 52" W	16/08/2014
maracujá do cerrado	Distrito de Morrinhos	16° 1' 12" S e 45° 58' 39" W	19/05/2014
coco guariroba	Distrito de Morrinhos	16° 1' 12" S e 45° 58' 39" W	30/03/2014



Figura 2: Localização do município de Arinos- Fonte: Marcelo X. Travassos.

Os frutos estavam sadios, com bom aspecto físico, sem injúrias ou perfurações (ver Figura 3 - A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M e N). Todos estavam maduros garantindo maior composição de açúcar e outras fontes bioenergéticas. Eles foram

envolvidos por sacos plásticos para evitar contaminações externas, acondicionados em caixa de isopor e posteriormente encaminhados para o Departamento de Fitopatologia da UNB (Universidade de Brasília) e guardados na câmara fria com a temperatura de 4 °C para manter as condições físicas dos frutos e evitar o processo de deteriorização. Em menos de 24 horas os frutos foram novamente verificados quanto suas condições físicas, selecionando os melhores, fotodocumentados e lavados superficialmente com água destilada com o objetivo de retirar excessos de poeira e outros componentes que não fossem inerentes ao fruto. Em seguida o excesso de água foi retirado com papéis toalha descartáveis e deixados secar a temperatura ambiente.

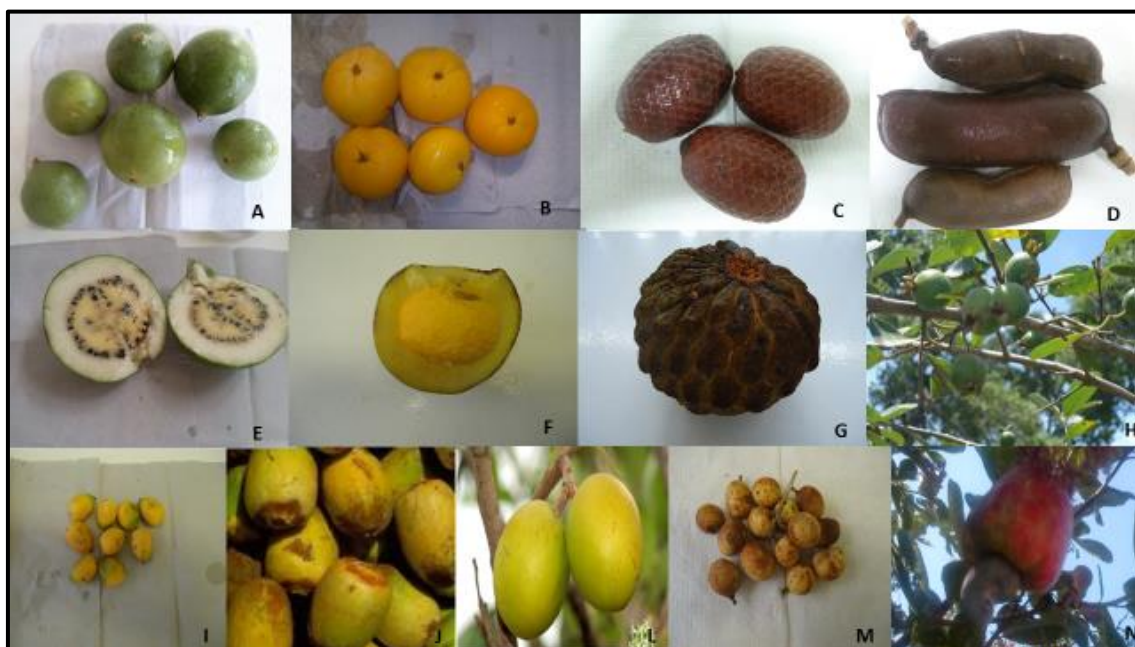


Figura 3: Frutos colhidos para análise:(A) maracujá do cerrado, (B) cagaita, (C) buriti, (D) jatobá do cerrado, (E) lobeira, (F) pequi, (G) araticum, (H) araçá, (I) coquinho azedo (J) coco guariroba, (L) mangaba, (M) pitomba e (N) caju do cerrado.

4.2- ISOLAMENTO DE LEVEDURAS EM MEIO DE CULTURA

Após passarem pela etapa de seleção, pedaços do frutos foram retirados e macerados e posteriormente pesados na quantidade de 10 gramas em uma balança de precisão. Foram distribuídas em 90 ml de água peptonada a 0,1 %, com três repetições. Os erlenmeyer foram levados ao homogenizador por 30 minutos com agitação de 150 rpm com a temperatura de 29°C para melhor diluição das polpas. A diluição seriada foi de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} com três repetições cada. A solução foi plaqueada com 100 microlitros espalhados homogeneamente com uma alça de Drigalski em placas de Petri no meio sólido MYGP (*Malt Yeast Glucose Peptone*) adicionando dois tipos de antibióticos: clorafenicol e estreptomicina (250 mL.L^{-1}) para impedir o crescimento de bactérias. O pH foi ajustado em 5,6 a 5,7 com auxílio de um peagâmetro. As placas ficaram na B.O.D em temperatura de 29°C sendo avaliado o crescimento das leveduras durante 4 dias. Estas etapas acima citadas estão ilustradas na Figura 4.

Após o período de incubação foi realizada leitura das placas para verificar crescimento das leveduras, características morfológicas e determinação do Número de Unidades Formadoras de Colônias UFC/g das 3 repetições sendo seu resultado expresso por uma média entre as três medições.

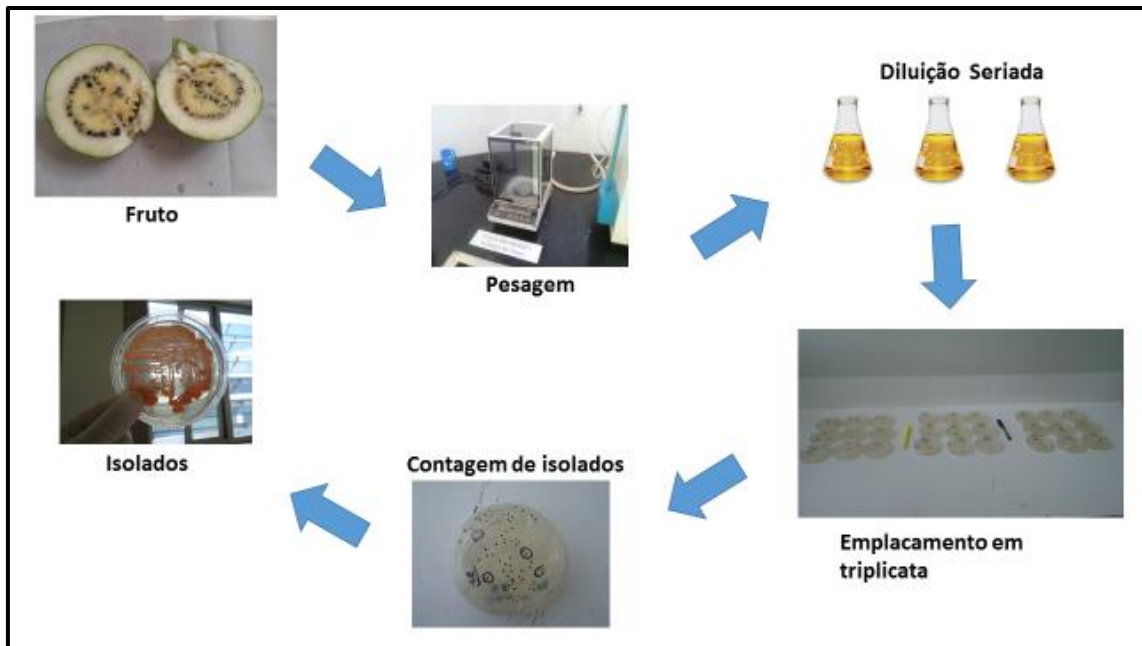


Figura 4: Metodologia de isolamento de leveduras em frutos do cerrado. O processo inicia no fruto em natura e finaliza com o isolamento da levedura.

4.3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As características fenotípicas analisadas foram, aspecto, cor, contorno, borda, superfície, perfil, tamanho, de acordo com DIAS (2010).

Para armazenamento dos isolados foram cultivados em meio MYGP líquido. Foram identificados com seus códigos e armazenadas em duplicatas a -80°C em criotubos com 700 microlitros de MYGP líquido com os isolados acrescidos 300 microlitros de glicerol a 50%.

4.4 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS POR DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO DE REGIÕES DE MICROSATÉLITES

Após a caracterização morfológica dos isolados, foram submetidos a processos de extração de DNA conforme protocolo modificado de KURTZMANN & FELL (1998). Foi utilizado um tampão de extração - 200mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA pH 8, 0,5% SDS, combinado com microesferas de vidro. A confirmação da qualidade da extração do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Na reação de polimerização da MSP-PCR foi utilizado inicialmente os iniciadores GTG₅ e M13 sendo escolhido o GTG₅ devido a melhor resolução nos resultados dos testes de ampliações iniciais. As reações ocorreram em microtubos sendo que cada um com volume final de 12,5 µL, de 10-20 ng de DNA, 20 pmol de primers iniciadores, 2,5 µL de tampão 5x (Promega[®]), 0,2 mM dNTPs a (dATP, ACTP, dGTP, dTTP), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 1,5 mM de MgCl₂ e água desionizada (Milli-Q) esterilizada para completar o volume final. A programação no termociclador foi de 94 °C desnaturação num tempo de 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por um minuto, 72°C por 45 segundos e como extensão final 72 °C por 6 minutos. A eletroforese foi feita com gel de agarose com a concentração de 1,2 % e sua corrida com voltagem de 70 V, amperagem de 400 A em um tempo de 4 horas. Posteriormente foram reveladas por fotodocumentador L-PIX Sti da marca Loccus Biotecnologia.

Para gerar os agrupamentos resultantes da MSP-PCR foi usado o programa computacional Bionumerics[®], utilizando a média de similaridade UPGMA (Unweighted

Pair Groups Method using Arithmetic Average) e o Coeficiente Dice para cálculo de similaridade.

4.5 - PCR E SEQUENCIAMENTO DO DOMÍNIO D1/D2 DO rDNA

Os representantes de cada grupo gerados pelo MSP-PCR, foram amplificados utilizando os dois iniciadores o NL1(5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAGGG 3') (KURTZMAN & ROBNETT, 1998). Cada fragmento gerado tem um tamanho de aproximadamente 600pb da região ribossomal 26S. A reação desta PCR D1/D2 foi realizada com volume final de 50 µL. As reações foram realizadas no termociclador com a programação de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para cada reação foi utilizado um microtubo contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada *primer* (NL1 e NL4), MgCl₂ 1,5 mM e 0,2 mM dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), tampão 10X 2,5 µL, a enzima Taq-polimerase da Invitrogen® com 0,5 µL completando com água Milli-Q. Os resultados gerados pela PCR foram verificados em eletroforese em gel de agarose 1,2% utilizando o marcador DNA Low Mass Ladder da Invitrogen®.

A enzima Exo-Sap foi utilizada para tratamento dos amplicons gerados pela PCR do D1/D2 e posteriormente enviados para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB) localizada em Brasília - DF onde o processo foi realizado de acordo com a metodologia de Sanger utilizando o sequenciador ABI3130xl da Applied Biosystems®.

4.6 - ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para analisar e editar as sequências foi utilizado o programa computacional BIOEDIT versão-7.1.3.0 e pareadas com as sequencias depositadas no banco de dados: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para gerar as árvores filogenéticas foram escolhidas as sequencias dos bancos de dados que tinham melhor cobertura gênica e mais de 95% de identidade, *E-value*, parâmetro de propabilidade entre duas sequências alinhadas ao acaso, com valor de zero ou negativo e porcentagem de cobertura acima de 95%.

O alinhamento e construção das árvores filogenéticas foram feitos pelo programa de informática MEGA 6 utilizando o método de Máxima Verossimilhança e teste de *bootstrap* de 1000 replicatas (TAMURA, 2011).

4.7 - CAPACIDADE DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Para verificação das enzimas produzidas pelas leveduras foi utilizado a metodologia modificada de SOUZA (2008), associada com a de LANDELL (2009). As leveduras foram replicadas em meio líquido MYGP (*Malt Yeast Glucose Peptone*) numa temperatura de 29 °C até que atingiram a concentração de 10^8 células/mL verificadas por contagem em Câmara de Newbauer. Com essa concentração foram inoculadas em *cup plates* “orifícios” com diâmetro de 6mm como mostra a Figura 5 em triplicata em meios específicos para cada tipo de teste enzimático conforme descrito no Anexo 1. Foram encubadas em B.O.D por 24h para realização da leitura. Após este período as placas foram lavadas com iodo 0,1 N para análise da amilase, vermelho do Congo 0,1% para análise da celulase e ácido clorídrico 5 N para análise da pectinase. Os testes de protease não foi necessário nenhuma substância reveladora. A produção

enzimática foi verificada por formação de halos que foram medidos com paquímetro sendo seus resultados expressos em mm.

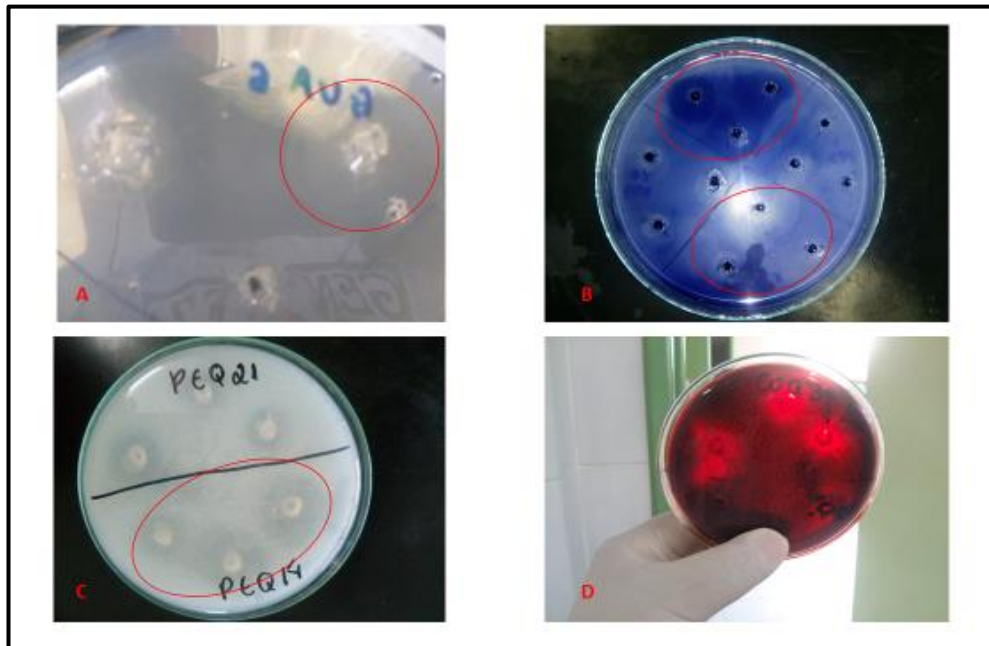


Figura 5: Testes enzimáticos de pectinase (A), amilase (B), proteinase (C) e celulase (D) dos isolados de leveduras em frutos do cerrado.

Para caracterização quantitativa das enzimas produzidas foi atribuído o seguinte parâmetro de classificação: ausência enzimática, presença enzimática com halo até 19 mm e forte presença enzimática com halo ≥ 20 mm.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

No resultado de UFC/g de fruto, os isolados de coco guariroba apresentaram um maior número de colônias se comparado com os outros frutos com $7,2 \times 10^4$ UFC/g, na sequência, temos o coquinho azedo com $5,8 \times 10^3$ UFC/g e, em terceiro, o caju do cerrado com $2,2 \times 10^3$ UFC/g. O pequi, a pitomba e a cagaita $> 1,0 \times 10^1$ UFC/g. Alguns frutos não apresentaram crescimento de colônias como ocorreu com o buriti, maracujá do cerrado, jatobá do cerrado e a lobeira. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Contagem de unidades formadoras de colônias por grama de fruto (UFC/g) de leveduras isoladas de frutos em MYGP.

Fruto	UFC/g
Araçá	$2,4 \times 10^2$
Araticum	$4,4 \times 10^2$
Buriti	N/C
Cagaita	$> 1,0 \times 10^1$
Caju do cerrado	$2,2 \times 10^3$
Coco guariroba	$7,2 \times 10^4$
Coquinho	$5,8 \times 10^3$
Jatobá do cerrado	N/C
Lobeira	N/C
Mangaba	$5,8 \times 10^2$
Maracujá do cerrado	N/C
Pequi	$> 1,0 \times 10^1$
Pitomba	$> 1,0 \times 10^1$

N/C - Não houve crescimento

Entre os frutos houve diferença na quantidade de isolados e nas morfologias. Os frutos que apresentaram maiores diversidades morfológicas e quantitativas foram coquinho e araticum, os que apresentaram menor diferença foram cagaita, pitomba e caju e, moderada variabilidade e quantidade ficaram os frutos pequi, coco guariroba, mangaba e araçá.

O caju do cerrado foi um dos frutos com maior UFC/g, mas apresentou pouca variabilidade morfológica, sendo que a quantidade de isolados não está relacionada com a diversidade. Os fatores que selecionam a comunidade de leveduras no fruto são primeiramente, a oferta de carboidratos, proteínas e lipídios e, conseqüentemente, às enzimas produzidas capazes de degradar estes substratos para converter em energia para o micro-organismo (TRINDADE, 2001).

Nos frutos lobeira, maracujá do cerrado, jatobá do cerrado e buriti não houve crescimento de leveduras sendo o processo repetido para confirmação. Não foi encontrado estudos na literatura que tiveram o objetivo de elucidar a ocorrência de leveduras em jatobá no cerrado e maracujá do cerrado sendo estes os primeiros resultados documentados. Os motivos desta ausência de crescimento não parece estar ligado ao substrato oferecido as leveduras, pois a lobeira apresenta grande quantidade de carboidrato e o buriti de lípidio (Tabela 1). Há poucos trabalhos relacionados com micro-organismo ao fruto de lobeira. VIEIRA (2014) conseguiu isolar actinomicetos e bactérias, mas não fungos e leveduras em frutos frescos de lobeira. O jatobá do cerrado pode ser explicado pelo fato dele produzir substâncias que inibem o crescimento tanto de bactérias como de leveduras. SOUZA (2008) constatou a capacidade antifúngica do extrato bruto do jatobá do cerrado sobre as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia spp.* Trabalhos como de BATISTA (2012) mostraram a capacidade

inibitória do óleo de buriti diante de bactérias em feridas de ratos e meios de cultura sendo usado como bactericida, porém não houve teste com fungos. Outro problema que pode ter influenciado no resultado foi a metodologia aplicada visto que o fruto buriti é muito rígido prejudicando o processo de diluição ao meio dificultando o acesso às leveduras. GALVÃO (2010) fez testes com maracujá - *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) e inibiu em até 16% o crescimento de *Candida albicans* demonstrando que este possui uma baixa capacidade antifúngica. Apesar de não ser da mesma espécie, o maracujá amarelo pertence ao mesmo gênero que o maracujá do cerrado, podendo ter algum composto em comum que iniba o crescimento das leveduras.

De acordo com as características fenotípicas foram isoladas no total de 108 na qual 23 não foram possíveis de serem recuperadas restando 85 isolados. Dentre os 85 isolados estavam divididos em: araticum -17 isolados (ARA); coquinho azedo - 21 (COQ); mangaba- 9 (MAN); pitomba- 5 (PIT); pequi-11 (PEQ); coco guariroba -7 (GUA); araçá- 9 (ARAA), cagaita- 3 (CAG) e caju do cerrado com também 3 isolados identificados com CAJ (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição de isolados por fruto hospedeiro

Fruto	Isolado	Quantidade
araçá	ARAA	9
araticum	ARA	17
cagaita	CAG	3
caju do cerrado	CAJ	3
coquinho azedo	COQ	21
coco guariroba	GUA	7
mangaba	MAN	9
pequi	PEQ	11
pitomba	PIT	5
Não recuperadas		23
Total		108

5.2-CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AGRUPAMENTO POR DENDOGRAMA.

O aspecto mais identificado entre as leveduras foi a pastosa, com 57 isolados no total. Em segundo lugar, com 22 isolados, a mucosa e 6 secas. 100% dos isolados da mangaba e araticum apresentaram característica pastosa. Já o coco guariroba teve na sua totalidade leveduras mucosas. A cor ficou relativamente dividida em duas: 43 beges e 34 brancas. O restante ficou distribuído em 3 rosas e 5 salmão. SPERANDIO (2012) obteve resultados parecidos com isolamento de leveduras em 5 frutos do cerrado na qual isolou em sua maioria colônias de leveduras de cores brancas e beges. Segundo KURTZMAN (2011) a cor pode nos dar uma direção em alguns casos de classificação, visto que leveduras vermelhas, laranja ou amarelo são características marcantes de alguns gêneros como *Phafia*, *Rhodospordium* e *Sporiodiobolus*, mas a grande a maioria das leveduras apresenta cor branca e bege.

Outras características avaliadas como contorno: 52 circular e 33 irregular, superfície: 49 lisas, 21 ondulada, 7 crenadas, 3 lobuladas e 5 filamentosa. Outro aspecto analisado na morfologia foi a borda, pois em sua maioria apresentou estrias concêntricas com 52 amostras, o restante foi dividido em 29 com estrias radiais, 3 com vales radiais e uma granulosa. O perfil obteve o resultado de 34 isolados lisa concêntrica com cume central seguida de 23 achatada, 17 lisa convexa, 5 lisa côncava, 4 crateriforme com pregas centrais e 2 lisa crateriforme. Quanto ao tamanho dos isolados a maioria era grande com 65 isolados (acima de 5 mm) seguido de 15 médias (2 a 5 mm) e apenas 5 pequenas (2mm).

As características morfológicas supracitadas ajudam na identificação dos isolados e também um dos primeiros passos para o descobrimento de novas espécies, porém não são muito confiáveis, pois sofrem interferências do ambiente, como tipo de

meio, pH, temperatura e substrato energético, que podem modificar a morfologia das colônias e confundir o resultado.

O programa PAST 2.17 gerou um dendograma com características morfológicas semelhantes. O resultado demonstra a formação de 12 agrupamentos (Figura 6). Este dado pode indicar que leveduras semelhantes estão colonizando frutos diferentes. O dendograma baseado em características morfológicas também nos fornece a dimensão da variedade de leveduras encontrada nos frutos do cerrado.

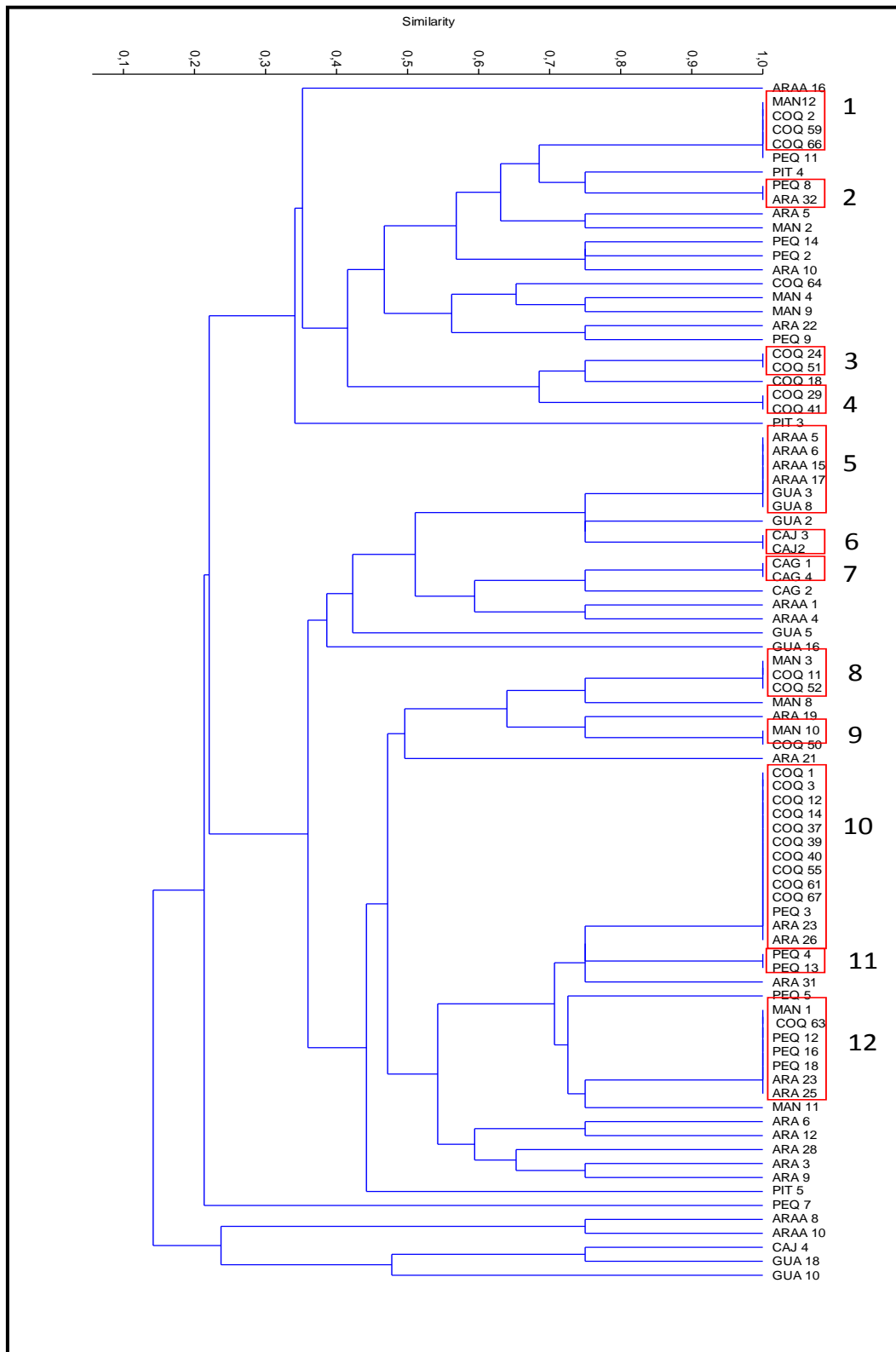


Figura 6 : Dendrograma de similaridade morfológica de acordo com DIAS (2010), feito no programa Past 2.17, utilizando o coeficiente Jaccard de similaridade. Foram gerados 12 agrupamentos sendo destacados de vermelho.

5.3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS

Os resultados do MSP-PCR confirmam a variedade de leveduras encontradas nos frutos e sua eficiência em estudos de biodiversidade em substratos ambientais. Seus resultados estão demonstrados nos anexos de 2 a 8.

A análise molecular por perfis eletroforéticos é muito importante, visto que apenas por análises morfológicas, bioquímicas e fisiológicas podem confundir muito e não ser conclusivas. Isso foi discutido no trabalho de SANTOS (2006), no qual foi relatada a dificuldade de diferenciar leveduras fermentativas usadas em bebidas, sendo como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*, utilizando MSP-PCR para diferenciá-las. Os resultados da MSP-PCR dos isolados dos frutos foram submetidos ao programa Bionumerics®. Seus resultados não foram elucidativos formando apenas 5 agrupamentos como podemos observar as Figura 7.

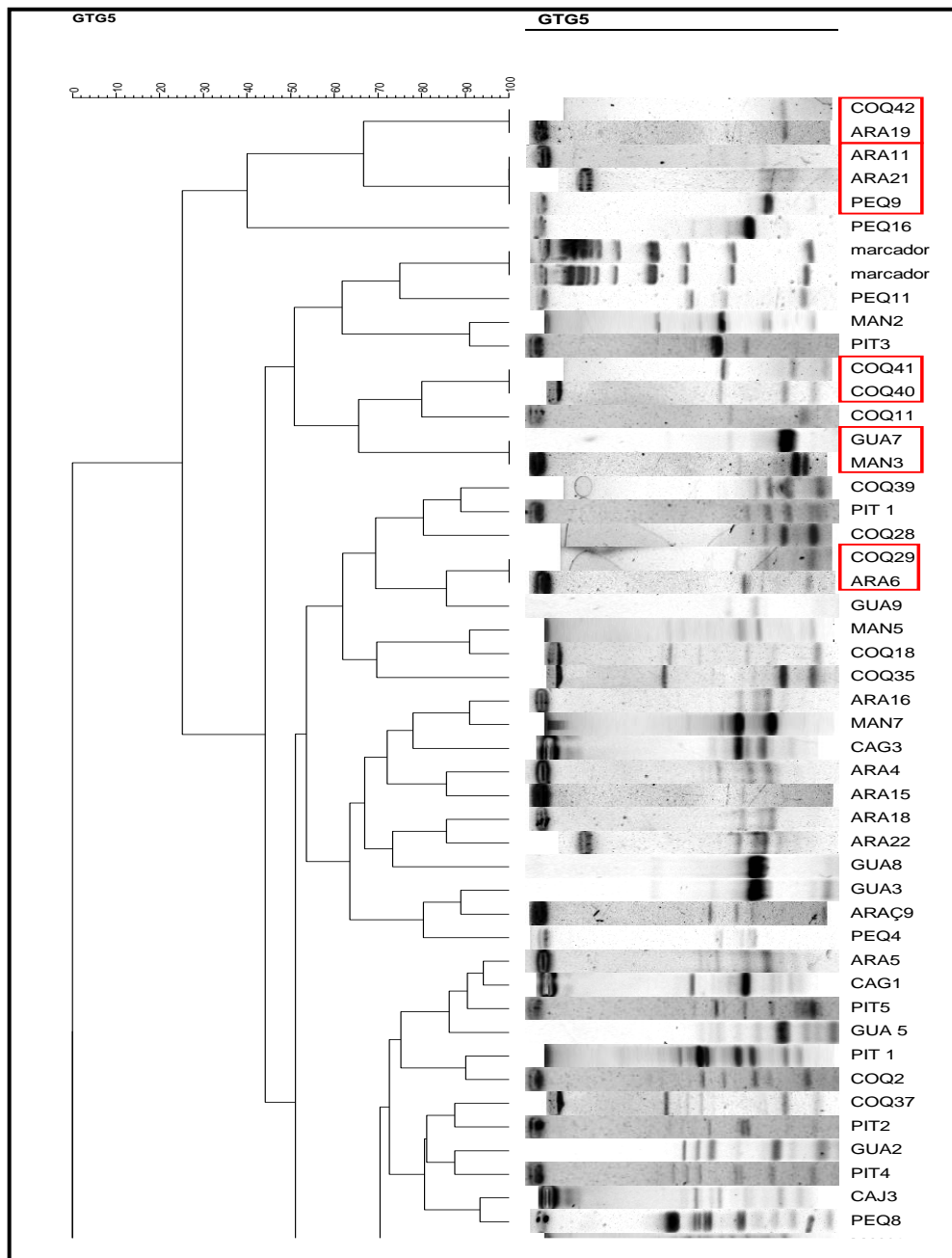


Figura 7: Dendograma de similaridade dos isolados de leveduras dos frutos do cerrado com o resultado dos MSP-PCR. A análise foi gerada com o algoritmo UPGMA e coeficiente de *Dice*. Foram formados 5 agrupamentos destacados em vermelho.

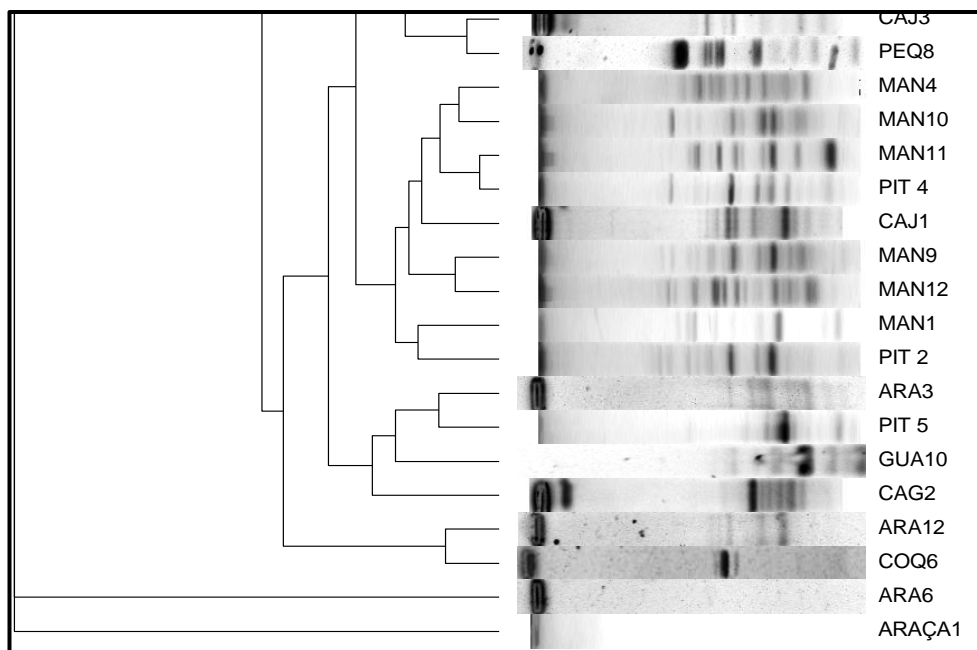


Figura 7– continuação: Dendograma de similaridade dos isolados de leveduras dos frutos do cerrado com o resultado dos MSP-PCR. A análise foi gerada com o algoritmo UPGMA e coeficiente de *Dice*.

Uma das explicações seria que a técnica de MSP-PCR é muito sensível, e pode gerar perfis diferentes dentro da mesma espécie (GADANHO, 2003). MOREIRA (2015) em seu trabalho com isolamento de leveduras de solo impactado com mineração também chegou a mesma conclusão tendo dificuldade de agrupar seus isolados por perfis eletroforéticos. Devido este resultado não satisfatório todos os isolados foram preparados para o sequenciamento do rDNA 26S.

5.4 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

Os resultados do sequenciamento de nucleotídeos de rDNA foram utilizados para construir as árvores filogenéticas conforme demonstrada nas Figuras 8 e 9.

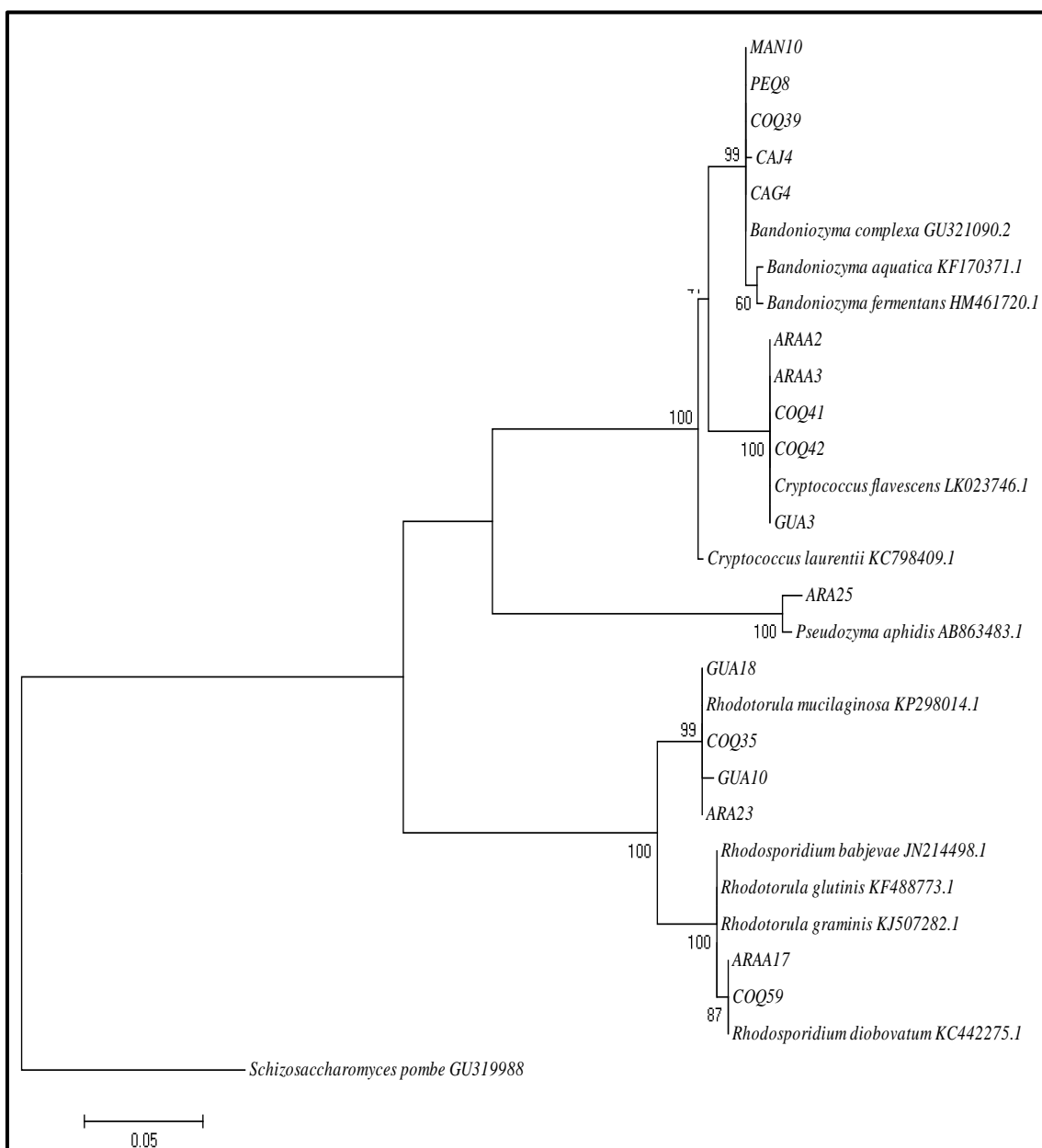


Figura 8: Árvore filogenética de leveduras basidiomicéticas criada pelo programa Mega 6 baseado no sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S. Metodologia aplicada para construção da árvore: Máxima verossimilhança e teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. Foi utilizado como grupo externo *Schizosaccharomyces pombe*.

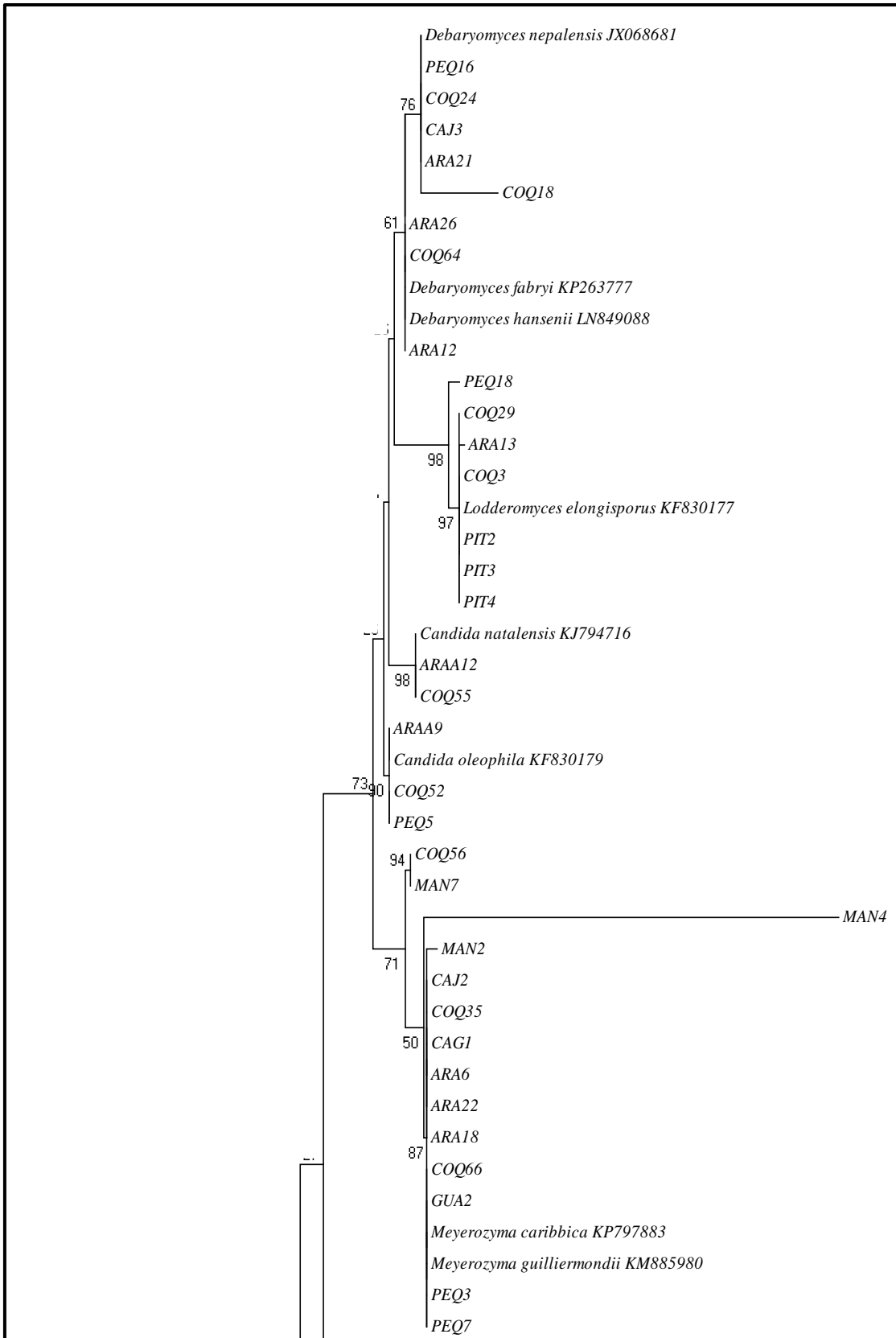


Figura 9: Árvore filogenética de leveduras ascomicéticas criada pelo programa Mega 6 baseado no sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S. Metodologia aplicada para construção da árvore: Máxima verossimilhança e teste de *bootstrep* com 1000 replicatas. Foi utilizado como grupo externo *Rhodorula muciliginosa*.

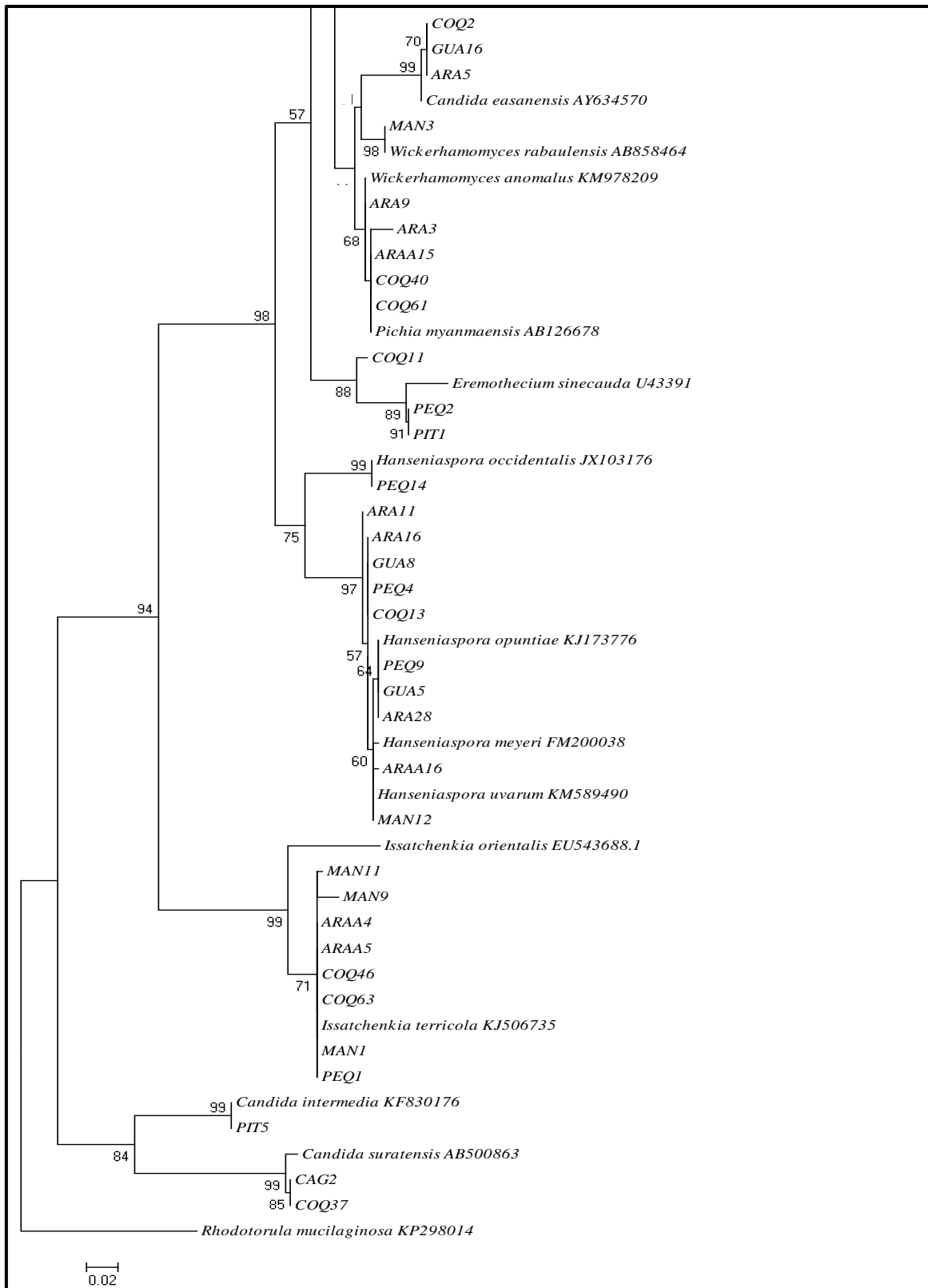


Figura 9 – continuação: Árvore filogenética de leveduras ascomicéticas criada pelo programa Mega 6 baseado no sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S. Metodologia aplicada para construção da árvore: Máxima verossimilhança e teste de *bootstrep* com 1000 replicatas. Foi utilizado como grupo externo *Rhodotorula mucilaginosa*.

A árvore de basidiomicetos englobam 17 isolados sendo divididos em 5 gêneros: *Bandoniozyma*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* e *Rhodospiridium*. Os isolados que estão agrupados no clado *Bandoniozyma* (MAN10, PEQ8, COQ34 e CAG4) apresentaram 99% de *bootstrap*, o clado *Cryptococcus* (ARAA2, ARAA3, COQ41, COQ42 e GUA3) com 100% de *bootstrap*, *Pseudozyma* (ARA25) com 100% de *bootstrap*, *Rhodotorula muciliginosa* (COQ35, GUA10 e ARA23) com 99% de *bootstrap* e *Rhodospiridium diobovatum* (ARAA17 e COQ59) com 87% de *bootstrap*. Entretanto podemos concluir a nível de espécies apenas os clados do gênero *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* e *Rhodospiridium*. O clado de gênero *Bandoniozyma* nos remete a informação de classificação apenas no nível taxonômico de gênero porque apresentam politonia havendo a necessidade de sequenciar no caso a ITS (FELL et al., 2000). O clado onde os isolados se agruparam ao gênero *Cryptococcus* podem ser classificados como *Cryptococcus flavescens* devido seu alto valor de suporte de *bootstrap* (100%) e estes isolados não se associam a outros membros do gênero. O ARA25 identificou com *Pseudozyma aphidis* (100% de *bootstrap*), ARAA17 e COQ59 com *Rhodospiridium diobovatum* (87% de *bootstrap*) e GUA18, COQ35, GUA10 e ARA23 com *Rhodotorula muciliginosa* (99% de *bootstrap*).

O outro grupo de leveduras, ascomicéticas, representaram a maioria dos isolados dos frutos hospedeiros com 67 leveduras distribuídos em 9 gêneros: *Meyerozyma*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Wickrhamomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Eremothecium* e *Lodderomyces*. A diferença encontrada entre espécies presentes nos dois filios já era esperado, visto que as amostras analisadas continham em maior proporção de partes da polpa dos frutos sendo essa região rica em fontes de carboidratos de mais simples assimilação características de colonização dos ascomicetos. Como não foi feita a desinfecção superficial, pode ocorrer isolamento de leveduras localizadas no

filoplano geralmente colonizadas por leveduras basidiomicéticas. Alguns trabalhos destacam essa diferença espacial, MAUTONE (2008) analisou apenas o filoplano de folhas de figueiras e obteve o resultado de 45 espécies: 8 ascomicéticas e 38 basidiomicéticas. TRINDADE (2002) analisou a ocorrência de leveduras em frutos maduros e polpas congeladas de pitanga, mangaba, umbu e acerola chegando a isolar 42 espécies ascomicéticas e 28 de basidiomicéticas.

Na árvore de ascomicéticas podemos observar que o gênero *Wickerhamomyces* possui duas identificações: uma com o isolado MAN3 bem relacionado com *Wickerhamomyces rabaulensis* com valores de *bootstrap* de 98% e *Wickerhamomyces anomalus* com o isolado ARA9 com 70% de *bootstrap*. Outro clado bem suportado foi *Lodderomyces elongisporus* que obteve 6 isolados: ARA13, COQ29, COQ3, PIT2, PIT3 e PIT4 sendo que estes tiveram um suporte de 96%. O COQ18 está bem próximo filogeneticamente porém não foi o suficiente para agrupar neste clado. Outro clado em que há necessidade de sequenciamento de ITS foi o do gênero *Meyerozyma*. Este gênero é recente, criado em 2010 (KURTZMAN e SUZUKI, 2010) para resolver o problema de duas espécies *Pichia guilliermondi* e *Pichia caribbica* que não se relacionava em seu grupo de origem. São espécies muito próximas filogeneticamente dificilmente separadas com a informação de apenas uma região gênica. O MAN4 está relacionado a este clado porém o resultado de sequenciamento ficou curto prejudicando o pareamento deste isolado. O gênero *Candida* teve o maior número de isolados relacionados. A *Candida natalensis* com COQ55 e ARAA12 (*bootstrap* 98%), *C. oleophila* - ARAA9, COQ52 e PEQ5 (*bootstrap* 91%), *C. easanensis* - COQ2, GUA16 e ARA5 (*bootstrap* 99%), *C. intermedia* - PIT5 (*bootstrap* 100%) e *C. suratensis* – CAG2 e COQ37 (*bootstrap* 100%). Com 8 representantes ficou o gênero *Issatchenkia terricola* com os isolados: MAN1, MA11, MAN9, ARAA4, ARAA5, COQ46, COQ63 e PEQ1 com valores de

bootstrap de 69%. O gênero de *Hanseniaspora* veio com 4 espécies: *Hanseniaspora occidentalis* com PEQ14 (99% *bootstrap*), *Hanseniaspora opuntiae* com os isolados PEQ9, GUA5 e ARA28. Os isolados ARA11, ARA16, MAN12, GUA8, COQ13, ARAA16, ficaram apenas na identificação de gênero pois agruparam com *Hanseniaspora uvarum* e *H. meyeri* também não sendo possível chegar a espécie por apenas uma região gênica. Os isolados PEQ16, COQ24, CAJ3, ARA21 e PEQ18 foram agrupados no clado *Debaryomyces nepalensis* com 75% de *bootstrap*. Como ocorreu no caso anterior não foi possível de chegar ao nível de espécies os isolados ARA26, COQ64 e ARA12, pois ocorreu politomia neste ramo havendo também a necessidade de buscar mais informação na região de ITS. A espécie *Pichia myanmaensis* agrupou os isolados ARA3, ARAA15, COQ40 e COQ61. Os isolados, COQ56 e MAN7 se mostram próximas filogeneticamente mas também há necessidade de sequenciar outra região gênica para identificação estes isolados. E o clado *Eremothecium sinicauda* agrupou com PIT1, PEQ2 e COQ11.

A partir do pareamento com as sequências do Genebank foram encontradas as seguintes espécies mais relacionadas filogeneticamente de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5: Resultado da identificação das leveduras em frutos do cerrado pelo pareamento com o banco de dados Genbank.

Cod. Isolados	Análogo Filogenético	Genebank	Cobertura %	E.value	Identidade %
PEQ3, PEQ7, GUA2, COQ66, ARA6, ARA18, ARA22, CAG1, COQ35, CAJ2 e MAN2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KM822611.1	100	0.0	99
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KP797883.1	100	0.0	99
CAG2 e COQ37	<i>Candida surattensis</i>	AB500863.1	100	0.0	100
PEQ16, COQ24, CAJ3, ARA21 e COQ18	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	JX06868.1	100	0.0	100
ARA26, COQ64 e ARA12	<i>Debaryomyces fabryi</i>	KP263777.1	100	0.0	99
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LN849088.2	100	0.0	100
PEQ 18, COQ29, ARA13, COQ3, PIT1, PIT2 e PIT4	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	KF830177.1	100	0.0	95
ARAA12 e COQ55	<i>Candida natalensis</i>	KJ794716.1	100	0.0	99
ARAA9, COQ52 e PEQ5	<i>Candida oleophila</i>	KF830179.1	100	0.0	100
COQ2, GUA16 e ARA5	<i>Candida easanensis</i>	AY634571.1	100	0.0	99
PIT5	<i>Candida intermedia</i>	KF830176.1	100	0.0	99
MAN3	<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	AB858464	99	0.0	100
ARA9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1	100	0.0	99
ARA3, ARAA15, COQ40 e COQ61	<i>Pichia myanmmaensis</i>	AB126678.1	100	0.0	99
COQ11, PEQ2 e PIT1	<i>Eremothecium sinecauda</i>	U43391.1	100	0.0	99
PEQ12	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	JX103176.1	100	0.0	100
PEQ9, GUA5 e ARA28	<i>Hanseniaspora opuntinae</i>	EU386744.1	100	0.0	99
ARAA16, MAN12, ARA11, ARA16, GUA8, PEQ14 e COQ13	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	FM200338	100	0.0	99
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KM978209.1	100	0.0	100
MA11, MAN9, ARAA4, ARAA5, COQ46, COQ63, MAN1 e PEQ1	<i>Issatchenkia terricola</i>	KJ506735.1	99	0.0	100
MAN10, PEQ8, COQ39, CAJ4, CAG4	<i>Bandoniozyma complexa</i>	GU321090.2	100	0.0	99
	<i>Bandoniozyma aquatica</i>	KF170371.1	100	0.0	99
	<i>Bandoniozyma fermentans</i>	HM461720.1	100	0.0	99
ARAA2, ARAA3, COQ41, COQ42 e GUA3	<i>Cryptococcus flavescens</i>	LK023746.1	99	0.0	100
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	KC798409.1	99	0.0	97
ARA25	<i>Pseudozyma aphidis</i>	AB617892.1	99	0.0	98
GUA18, COQ35, GUA10 e ARA23	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KP760069.1	99	0.0	100
COQ59 e ARAA17	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	KC442275.1	99	0.0	99
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	KC442279.1	100	0.0	99
	<i>Rhodotorula graminis</i>	KJ507282.1	100	0.0	99

Os resultados obtidos de identificação de leveduras nos frutos araticum, coquinho, pitomba, coco guariroba são inéditos. Usando esta metodologia de identificação em frutos do cerrado foi encontrado na literatura apenas dois trabalhos: SPERANDIO (2015) estudando frutos murici e cagaita identificou por sequenciamento do gene 26S as leveduras: *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma hubeiensis* (cagaita) e *Meyerozyma* sp., *Cryptococcus nemorosus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pseudozyma* sp., *Pichia sydowiorum*, *Candida* sp., *Pichia hubeiensis*, *Meyerozyma guilliermondii* em murici. Neste fruto identificamos as leveduras *Candida suratensis*, *Bandoniozyma complexa* e *Meyerozyma guilliermondii* mostrando outros tipos de espécies de leveduras que habitam este fruto. ARAÚJO (2015) que isolou leveduras em três frutos do cerrado: guavira, pinha e ingá por meio dos quais conseguiu identificar espécies *Candida citri*, *Wickerhamomyces ciferrii*, *W. kudriavzevii*, *Meyerozyma caribbica* e *Saccharomyces* sp. Em ambos trabalhos acima citados apenas *Rhodotorula mucilaginosa* foi identificado em comum dentre os 13 frutos estudados.

Algumas das leveduras identificadas já foram encontradas em outros frutos. PELLICCIA (2011) verificou, na superfície de maçãs e peras do Norte da Itália, após lavagem, a presença de várias leveduras, *Candida oleophila*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis* sendo a predominante *Meyerozyma guilliermondii*. VILELA (2011) conseguiu encontrar 40 isolados de leveduras no fruto de *Coffea arabica* L. em processamento via seca e via semisseca de café, estando presente *Rhodotorula mucilaginosa*. BEZERRA (2012) isolou e identificou 13 espécies de leveduras de uvas e mostos: *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*.

Grande parte dos isolados ascomicéticos pertence ao gênero *Candida* com 11 isolados. TRINDADE (2004) em análise dos frutos umbu (*Spondias tuberosa*) e mangaba (*Hancornia speciosa*), dois frutos encontrados no cerrado, verificou que as espécies predominantes também pertenciam ao gênero *Candida*, fato esse que proporcionou a descrição de uma nova espécie: *Candida sergipensis*.

A grande maioria das leveduras estava presente em mais de um fruto hospedeiro sendo encontrados 17 agrupamentos. Este resultado é bem maior do que o realizado pelo programa Bionumercs® que teve apenas 5 grupos semelhantes. Os frutos estão localizados na mesma região e podem ter contato com vetores que carregam as leveduras como vento, água, insetos e seus excrementos (TRINDADE, 2001 e JINDAMORAKOT, 2004). As drosophilas são os principais vetores entre frutos maduros ou em estado de apodrecimento (TRINDADE, 2002). ANGELIS (1983), encontrou diferentes exemplares de espécies do gênero *Candida*, *Rhodotorula* e *Kloecker* em ninhos de formigas *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata*. Os fatores citados podem ter contribuído para a colonização da mesma levedura em mais de um fruto.

Como comentado anteriormente agrupamento pelo Bionumercs® pode não ter sido eficiente por causa dos diferentes perfis gerados nos perfis eletroforéticos dentro da mesma espécie.

5.5 - RESULTADOS DOS TESTES ENZIMÁTICOS

Os resultados por isolado estão demonstrados na Tabela 6. A metodologia aplicada foi eficiente e mostrou a formação de halo caracterizando a ação enzimática produzida por cada isolado.

Tabela 6: Resultados de testes enzimáticos de isolados dos frutos do cerrado.

Fruto	Amilase	Celulase	Protease	Pectinase
coco guariroba				
Código				
GUA 2	(-)	(+)	(+)	(+)
GUA3	(-)	(-)	(+)	(++)
GUA 5	(++)	(+)	(-)	(-)
GUA8	(-)	(-)	(-)	(-)
GUA10	(++)	(+)	(++)	(++)
GUA16	(-)	(-)	(-)	(-)
GUA18	(-)	(++)	(+)	(-)
Pitomba				
Amilase				
PIT1	(-)	(-)	(-)	(-)
PIT 2	(-)	(-)	(-)	(-)
PIT 3	(-)	(-)	(-)	(-)
PIT 4	(++)	(-)	(-)	(-)
PIT 5	(-)	(-)	(+)	(-)
Mangaba				
Amilase				
MAN 1	(-)	(+)	(+)	(-)
MAN 2	(-)	(-)	(-)	(-)
MAN 3	(-)	(-)	(-)	(-)
MAN 4	(++)	(-)	(-)	(-)
MAN 7	(-)	(-)	(-)	(-)
MAN 9	(-)	(+)	(+)	(-)
MAN 10	(-)	(+)	(-)	(-)
MAN 11	(-)	(-)	(++)	(-)
MAN 12	(-)	(-)	(-)	(-)
Cagaita				
Amilase				
CAG 1	(-)	(+)	(+)	(-)
CAG 2	(-)	(-)	(++)	(-)
CAG 4	(-)	(-)	(++)	(+)
Caju cerrado				
Amilase				
CAJ 2	(-)	(-)	(-)	(-)
CAJ 3	(-)	(-)	(-)	(-)
CAJ 4	(-)	(-)	(+)	(-)

(-) ausência, (+) halo até 1,9 mm e (++) halo \geq 2,0 mm

Continuação Tabela 7- Resultados de testes enzimáticos de isolados dos frutos do cerrado.

Fruto	Amilase	Celulose	Protease	Pectinase
Araticum				
ARA 3	(-)	(+)	(-)	(-)
ARA 5	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 6	(-)	(+)	(-)	(-)
ARA 9	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 10	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 11	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 12	(-)	(-)	(-)	(+)
ARA 13	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 16	(-)	(+)	(-)	(+)
ARA 18	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 21	(+)	(-)	(-)	(+)
ARA 22	(-)	(+)	(-)	(-)
ARA 23	(-)	(-)	(+)	(-)
ARA 25	(-)	(-)	(-)	(-)
ARA 26	(-)	(-)	(+)	(+)
ARA 28	(+)	(+)	(-)	(-)
ARA 31	(-)	(-)	(-)	(-)
Pequi				
Pequi	Amilase	Celulose	Protease	Pectinase
PEQ 2	(-)	(-)	(++)	(-)
PEQ 3	(-)	(+)	(-)	(-)
PEQ 4	(-)	(-)	(+)	(-)
PEQ 5	(++)	(-)	(+)	(-)
PEQ 7	(-)	(-)	(-)	(-)
PEQ 8	(-)	(-)	(-)	(+)
PEQ 9	(-)	(+)	(++)	(-)
PEQ 12	(-)	(+)	(+)	(-)
PEQ 14	(-)	(-)	(++)	(-)
PEQ 16	(-)	(+)	(++)	(-)
PEQ 18	(-)	(+)	(-)	(-)
Araçá				
Araçá	Amilase	Celulose	Protease	Pectinase
ARAA 3	(++)	(+)	(-)	(-)
ARAA 2	(+)	(-)	(-)	(+)
ARAA 4	(-)	(-)	(-)	(-)
ARAA 5	(-)	(-)	(-)	(-)
ARAA 9	(-)	(-)	(+)	(-)
ARAA 12	(-)	(-)	(-)	(-)
ARAA 15	(+)	(-)	(-)	(-)
ARAA 16	(+)	(+)	(+)	(-)
ARAA 17	(-)	(-)	(+)	(-)

(-) ausência, (+) halo até 1,9 mm e (++) halo \geq 2,0 mm

Continuação da tabela 7 - resultados de testes enzimáticos de isolados dos frutos do cerrado

Fruto coquinho código	Amilase	Celulose	Protease	Pectinase
COQ 2	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 3	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 11	(++)	(++)	(++)	(-)
COQ 13	(-)	(-)	(+)	(-)
COQ 18	(-)	(-)	(++)	(-)
COQ 24	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 29	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 35	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 37	(-)	(-)	(+)	(+)
COQ 39	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 40	(-)	(-)	(+)	(-)
COQ 41	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 42	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 46	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 52	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 55	(-)	(+)	(-)	(-)
COQ 59	(-)	(-)	(+)	(+)
COQ 61	(-)	(-)	(-)	(-)
COQ 63	(-)	(+)	(+)	(-)
COQ 64	(-)	(-)	(+)	(-)
COQ 66	(-)	(-)	(-)	(++)

(-) ausência, (+) halo até 1,9 mm e (++) halo \geq 2,0 mm

Do total dos 85 isolados, 54 produziram algum tipo das enzimas testadas, 29 apresentaram apenas uma enzima, enquanto 25 apresentaram no mínimo duas. O fruto em que seus isolados produziram maior quantidade de enzimas (celulase, pectinase, protease e amilase) foi o coquinho azedo, com total de 18 isolados; em segundo, o pequi e o araçá, com 14 isolados.

A figura 10 mostra a porcentagem de isolados produtores das enzimas celulase, pectinase, protease e amilase destacando a protease ocupando 35% do total produzidas.

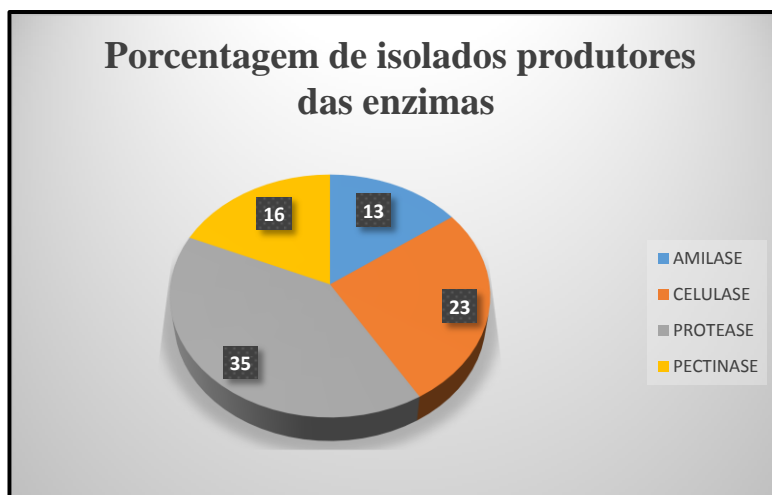


Figura 10: Porcentagem de isolados de leveduras de frutos do cerrado produtores das enzimas amilase celulase, protease e pectinase.

A pectina é um polissacarídeo que faz parte da parede celular que vai despolimerizando com a evolução do amadurecimento do frutos (PAIVA, 2009). Este fator pode ter influência nos resultados das produções enzimáticas mais baixa de pectinase produzidas pelas leveduras visto que o fruto analisado estava totalmente maduro não teria necessidade de produção em grande escala destas enzimas. Isso pode ser reflexo da fraca expressão desta enzima em quase todos isolados. OLIVEIRA (2007) isolou 250 leveduras de flores, frutos, tecido vegetal necrosado, insetos e solos da região Semi-árida baiana e apenas 33 apresentaram capacidade de produzir enzimas pectinolíticas. TRINDADE (2002) obteve em seu trabalho maiores resultados estudando a comunidade de leveduras em frutas como pitanga, mangaba, umbu e a acerola congeladas sendo testados 381 isolados, entre os quais apenas 16 apresentaram atividade pectinolítica. Em todos os trabalhos os frutos estavam maduros.

Entre as produções enzimáticas pelas leveduras testadas a que menos se expressou foi a amilase. É uma das maneiras de armazenamento de carboidratos nos frutos e na forma de amido. Os frutos analisados de acordo com a Tabela 1 mostram baixas porcentagens de carboidratos havendo pouca variação de porcentagem entre os

frutos com excessão da lobeira com alta porcentagem de carboidratos (84,99%) e o coquinho azedo com a mais baixa porcentagem (2,8%). A quantidade deste polissacarídeo pode refletir na baixa expressão desta enzima. Para nível de comparação o arroz cru que é um dos grandes armazenador de carboidrato produz em 100g uma quantidade de 78,8 % (TACO, 2011). FUENTEFRIA 2004, também obteve baixa porcentagem de leveduras isoladas em flor, com capacidade amilolítica, cerca de 23%, ou seja, 19 isolados em um total 89. DE OLIVEIRA (2015) com leveduras isolados de solos também chegaram a resultados baixos com 5% de isolados capazes de produzir amilase. PEIXOTO (2014) também verificou a baixa capacidade de leveduras em produzir enzimas que degradam amido, pois isolou 182 leveduras coletadas de grãos de pólen, flores e frutos maduros, sendo que apenas 11 delas apresentaram atividade amilolítica, ou seja, cerca de 6%. Essas porcentagens diferenciadas podem estar ligadas também ao tipo de ambiente em que a levedura está hospedada.

Uma das justificativas da baixa produção da celulase deve ao fato de que a enzima encontra dificuldade de acessar a celulose por causa da barreira de lignina encontrada na parede celular (THIEMANN, 1980). Os resultados enzimáticos das celulases corroboram com outros trabalhos. FUENTEFRIA (2004), que encontrou 24% de isolados em flor *Hibiscus rosa-sinensis*. BUZZINI (2002) isolaram 358 leveduras ambientais de florestas tropicais onde nenhuma espécie apresentou capacidade de produzir celulase. Outros resultados de trabalhos já mostram a grande capacidade de leveduras produzirem este tipo de enzima. MENDES (2012) isolou 83 leveduras em ninhos de formigas sendo que 43% das estirpes produziram celulases. Este resultado se deve a oferta de celulose no solo sendo este polissacarídeo mais abundante neste ambiente.

A enzima protease foi produzida por 35 % do total enzimático. O fruto que mais apresentou leveduras proteolíticas foi o coquinho com 7 isolados e o que menos apresentou foi o caju e a pitomba, com nenhum isolado. Vários fatores podem interferir na produção enzimática da protease como temperatura ótima para cada isolado, pH a concentração do substrato e o metabolismo ligado ao processo de divisão celular (NEVES, 2006). Outra característica deste teste em relação ao de outros trabalhos e o meio utilizado para induzir a produção da protease: o leite desnatado mais a gelatina em pó, ambos contendo caseína homólogas. Este fato pode ter influenciado no resultado da produção enzimática pois a enzima expressada conseguia quebrar os dois tipos de proteínas. MOLNÁROVÁ (2014) em estudo de leveduras isoladas de flores, frutos e folhas divergiu os resultados de produção de protease em meios a base de leite e em meio a base de gelatina em pó, sendo que as leveduras em flores apresentaram 57% de capacidade proteolítica em meio a base de gelatina caindo para, aproximadamente, 24% em meio a base de leite em pó (Skim-Milk).

Em todos os frutos estudados foram encontradas mais de uma espécie de leveduras hospedeiras podendo ocorrer uma relação de interação mutualística enzimática entre elas não havendo a necessidade de todas produzirem ao mesmo tempo o mesmo tipo de enzima. O fato dos frutos também possuírem as enzimas estudadas e já estarem em uma fase de maturação pode influenciar nas leveduras a quantidade de enzima a ser secretada.

Estes testes são os primeiros passos para verificação enzimáticas nestas leveduras isoladas de frutos nativos do cerrado sendo necessário mais avaliações.

A partir deste trabalho damos os primeiros passos para investigar o potencial enzimático de leveduras isoladas de frutos dos nativos do cerrado e apresentando mais uma opção de estudo para finalidades biotecnológicas.

6- CONCLUSÃO

Foram recuperados 85 isolados de leveduras em 9 frutos dos 13 frutos estudados: pequi, mangaba, pitomba, coco guariroba, araçá, caju do cerrado, cagaita, coquinho azedo e araticum. Não houve crescimento de leveduras em 4 frutos: maracujá do cerrado, buriti, lobeira e jatobá do cerrado.

Nos frutos pequi, pitomba, cagaita os cálculo de UFC/g de fruto são de $>10 \times 10^1$ UFC/g devido a quantidade de isolados crescidos nas placas. O fruto que mais apresentou crescimento de leveduras foi o coco guariroba com $7,2 \times 10^4$ UFC/g e que apresentaram menor crescimento araçá com $2,2 \times 10^2$ UFC/g. Os valores encontrados entre essas duas referências citadas estão araticum com $4,4 \times 10^2$ UFC/g, mangaba com $5,8 \times 10^2$ UFC/g, coquinho com $5,8 \times 10^3$ UFC/g, e caju do cerrado com $2,2 \times 10^3$ UFC/g.

De acordo com a análise morfológica as leveduras foram reunidas em 12 agrupamentos com características iguais.

A caracterização molecular por MSP-PCR utilizando o iniciador GTG5 foi gerou alta informação sobre a variabilidade genética das leveduras presente nos frutos hospedeiros por perfis eletroforéticos e por este motivo dificultou o agrupamento pelo Bionumercs®.

O resultado do sequenciamento do domínio D1/D2 pela região do gene 26S demonstrou a presença de 14 gêneros. Em muitos isolados apenas essa região não conseguiu identificar ao nível de espécie sendo necessário sequenciar a região ITS.

Os testes enzimáticos apresentaram como resultados 54 leveduras que produziram algum tipo de enzima ou seja 67,5%, produziram mais de uma enzima que corresponde a 31,25%. As proteases foram as enzimas mais produzidas pelos isolados,

com 35% do totalde leveduras, seguidas da celulase - com 23 %, pectinase - com 16% e amilase com 13%.

Não foram encontrados na literatura atual relatos de leveduras nos frutos hospedeiros pitomba, araticum, maracujá do cerrado, jatobá do cerrado, coquinho azedo, coco guariroba sendo inéditos os resultados deste trabalho tanto na análise de identificação de leveduras quanto ao seu potencial enzimático.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.295-299, 2012.

ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, 38: 145-80, 2000.

ANGELIS, C.; SERZEDELLO, A.; DE ANGELIS, D. F. Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, São Paulo, v.8, p.149-151, 1983.

ARAÚJO, M. A.M. **Isolamento e Seleção de Leveduras para Produção de Enzimas de Interesse Industrial a partir de Frutos do Cerrado**. Campo Grande. 2015. p 67. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica Dom Bosco- UCDM.

ASCHEHOUG, E. T., METLEN, K. L., CALLAWAY, R. M., & NEWCOMBE, G. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. **Ecology**, v. 93, n. 1, p. 3-8, 2012.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamental and applications**. 4. ed. Redwood: Benjamin/Cummings Science Publishing, 643p. 1997.

BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **Int. J. Food Microbiol.** 153, 243–259, 2012.

BARY, A. *Morphologie in physiologie der Pilze, Flechten und Myxmyceten*. **Leipzig**: Engelan, 316 p, 1866.

BASÍLIO, A.C.M., DE ARAUJO, P.R. , DE MORAES, J.O.F., DA SILVA FILHO, E.A., DE MORAES, M.A., SIMÕES, D.A. Detection and identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Food Microbiology**, 27 (2) 205-209. 2008.

BATISTA, J. S., OLINDA, R. G., MEDEIROS, V. B., RODRIGUES, C. M. F., OLIVEIRA, A. F., PAIVA, E. S. & MEDEIROS, A. D. C. Atividade antibacteriana e

cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136-141, 2012.

BEZERRA, C. D. S. **Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividade enzimáticas para melhoramento de vinhos**. São José do Rio Preto, 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista- UNESP.

BUSH, U, NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **J. Chromatography**, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CAMPOS, R. P. HIANE, P. A. RAMOS, M. I. L. RAMOS FILHO, M. M. MACEDO, M. L. R. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. p. 41-49. 2012.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.. Recursos microbiológicos para Biotecnologia. URL: [http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias% 20_Vanderlei% 20Fina_. pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf), 2001.)

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N.. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, MARCELO TAVARES DE. Mycodiversity Associated with Trees of *Copaifera langsdorffii* Desf. in Brasília, the Federal District of Brazil. **Floresta e Ambiente**, n. AHEAD, p. 0-0, 2015.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Appl Microbiol Biotechnol** 95(1):47–59, 2012.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S.C.. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Biociências**, v.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras – MG: Editora UFLA, 368p, 2010.

DINIZ-FILHO, J. A. F. Agriculture, habitat loss and spatial patterns of human occupation in a biodiversity hotspot. **Sci. Agric**, vol.66, n.6, pp. 764-771, 2009.

DURIGAN, GISELDA. **Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada**. Páginas & Letras Editora e Gráfica, 2004.

PAIVA, EMMANUELA P.; LIMA, MARIANNE S.; PAIXÃO, JOSE A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G. & STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1351-1371, 2000.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J. F., VASUDEVAN, T. G., OTERO, R. C., & BRIONES, A. I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 261-266, 2004.

FRANZON, R. C. Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2009.

FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. Porto Alegre. 2004. 131p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

FUJITA, L. F. F. **Caracterização química, microbiológica e farmacognóstica da polpa de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart) Becc) produzida em Arinos-MG**. São Paulo, 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista- USP.

GADANHO, M.; ALMEIDA, J. M. G. C. F.; SAMPAIO, J. P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.217-227, 2003.

GALVÃO, K. C. S., DOS SANTOS, S. S. F., LEÃO, M. V. P., & GONÇALVES, C. R. Análise da atividade inibitória de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* sobre *Candida albicans*. **Revista Biociências**, v. 16, n. 2, 2010.

GALVÃO, MATTHEWS LOBO. Associação entre fungos e sistema radicular de plantas do Pantanal Matogrossense. **Global Science and Technolog**, v. 7, n. 2, 2014.

GOLDSTEIN, GUILLERMO. Water economy of Neotropical savanna trees: six paradigms revisited. **Tree physiology**, v. 28, n. 3, p. 395-404, 2008.

GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, GOSWAMI VK, CHAUHAN B Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem**, 38: 1599-1616, 2003.

HAMAMOTO, M. Systematic study of basidiomycetous yeast- evolution of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodosporidium*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, p.409-413, 2002.

HAMMER, OYYIND; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-Palaeontological statistics. , v. 25, n. 07, p. 2009, 2001.

INACIO, J.; PEREIRA, A.; SPENCER-MARTINS, I. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selectd plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p.344-353, 2002.

JINDAMORAKOT, S., AM-IN, S., THUY, T. T., DUY, N. D., KAWASAKI, H., POTACHAROEN, W. & NAKASE, T. *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov. and *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov., three new species of yeasts isolated from insect frass in Thailand. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 50, n. 5, p. 261-269, 2004.

JÚNIOR, ALOISIO FREITAS CHAGAS. Promoção de Crescimento em Feijão-Caupi inoculado com rizóbio e *Trichoderma spp.* no cerrado. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 190-199, 2014.

KARINA BRITO DOS SANTOS, S. **Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto* por PCR-fingerprinting**. Recife, 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Pernambuco- UFPE.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**. Belo Horizonte V.1, p-147-155, 2005.

KONEMAM, E.W. **Diagnóstico microbiológico**. Medsi, São Paulo, 2001.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

KURTZMAN, C. P. & SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v.51, p.2-14, 2010.

KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek** v.73, p.331-371, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. Biodiversity and Ecophysiology of yeasts. **Springer**: 2006.

KURTZMAN, CLETUS P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **The yeasts, a taxonomic study, 5th edn. Elsevier, Amsterdam**, p. 87-110, 2011.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de Itapuã-Viamão/RS**. Porto Alegre, 2009. 187p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS.

LEBEN, C. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria in buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v. 78, p. 179-185, 1988.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M. & SAMPAIO, J. P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 4, p. 313-322, 2003.

LOTTERMANN, M. T. **Purificação e caracterização estrutural de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Saccharomyces cerevisiae* “MFL”**. Brasília, 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Brasília – UNB.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque de Itapuã, RS, Brasil**. Porto Alegre, 2008. 124f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS.

MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose**. Viçosa, 2010. 94 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Viçosa- UFV.

MENDES, THAIS D. et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MEYER, S. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Descriptions of anamorphic ascomyceteus genera and species. The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. **Elsevier**, Amsterdam, The Netherlands, p. 476-477, 1988.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1648-1656, 1995.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. <www.mma.gov.br/bioma/cerrado>. Acesso em 16/02/2015.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. <www.mma.gov.br/biomas/cerrado/conservacao-e-uso-sustentavel>. Acesso 16/02/2015.

MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**. v. 20, n. p. 62-74, 2006.

MOLNÁROVÁ, JANA; VADKERTIOVÁ, RENÁTA; STRATILOVÁ, EVA. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. S1, p. S74-S84, 2014.

MOREIRA, G. A. M . **Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno**. Brasília, 2015. 106 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília- UNB.

NAVARRETE, A. A. **Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. São Paulo, 2009. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo-USP.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 299-306, 2006.

OLIVEIRA, M. P. M. **Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau**. Piracicaba, 2015. 66 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ.

OLIVEIRA, R. Q. **Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano**. Feira de Santana, 2007. 123p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS.

PEIXOTO, ABRAÃO BRITO; DE ALMEIDA, NINA AGUJARO; MAUGERI, FRANCISCO. Bioetano de fonte amilácea produzido por leveduras silvestre. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 2, n. 2, p. 25-39, 2014.

PELLICCIA, C., ANTONIELLI, L., CORTE, L., BAGNETTI, A., FATICHENTI, F., CARDINALI, G. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. **Ann. Microbiol.** 61 (4), 965 e 972, 2011.

PETRINI, J. O. ANDREWA, J.; HIRANO, S. S. Fungal endophytic of tree leaves. In: *Microbial Ecology of leaves*, **Spring Verlag**, p. 179-197, 1991.

RAMÍREZ CASTRILLÓN, M. **Tipagem molecular de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil: padronização de MSP-PCR Fingerprinting**. Porto Alegre, 2012. 94p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS.

- RAO, MALA B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S.B.; CORRÊA, G.F. Pedologia: base para distinção de ambientes. Viçosa: **NEPUT**, 304 p, 1995.
- RIBEIRO, J.F. WALTER, B.M.T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. **Ecologia e flora**. v. 1. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. 2008.
- ROCHA, M. S.. **Compostos bioativos e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense**. Teresina, 2011. 93p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Piauí- UFPI.
- ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review of Phytopatology**, 30: 225-243, 1992.
- SANTOS, E. A., DE OLIVEIRA, R. B., MEDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast associated with flower and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Review of Microbiology**, v.27, p.33-40, 1996.
- SAXENA, R. K. et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 260-265, 2007.
- NEVES, KILMA CRISTIANE SILVA; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO; TEIXEIRA, MARIA FRANCISCA SIMAS. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 299-306, 2006.
- SILVA, D. D., SILVA, J. Á., JUNQUEIA, N. T. V. & ANDRADE, L. R. M.. **Frutos do Cerrado** – Brasília: Embrapa Informação e Tecnológica, 2001.
- SILVA, M. H. R; GUERRA, O. G; BLINI, R. C. B. Isolamento de linhagens de levedura de folhas de espécies arbóreas da biodiversidade do cerrado produtoras de amilases. **Colloquium Vitae**. v.. 5, n. Especial, p. 09-15, Presidente Prudente, 2013.
- SILVA, M. R., LACERDA, D. B. C. L., SANTOS, G. G., & MARTINS, D. M. D. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, 38(6), 1790–1793, 2008.

SILVA, S. S.; SANTA IZABEL, T.S.; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos em algumas áreas do bioma Caatinga. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 65, n. 2, p. 527-538, 2014.

SOUZA, A. C. M. Atividade antimicrobiana de *Hymenaea martiana* sobre isolados de *Cryptococcus* e dermatófitos. Anais do V Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, Campus Samambaia- 06 a 10 de outubro.UFG- Universidade Federal de Goiás-2008.

SOUZA, HELENIRES QUEIROZ; DE OLIVEIRA, LUIZ ANTONIO; SOUZA ANDRADE, JERUSA. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, 2008.

SPERANDIO, E. M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. Brasília, 2012. 93p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – UnB.

SPERANDIO, E. M.; VALE, H. M. M.; MOREIRA, G. A. M. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. **Fungal Biology**, 2015.

STEELE D. B., STOWERS M. D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.** 45 89–106, 1991. TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol**, v.28, n.10, p.2731-2739, 2011.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO) <www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf>.Acesso 16/02/2015.

THIEMANN, J. E. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, p. 168-185, 1980.

TOURNAS, V.H., HEERES, J., BURGESS, L. Moulds and yeast in fruit salads and fruit juices. **Food Microbiology**. v.23, p 684-688, 2006.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, p. 294-300, 2002.

TRINDADE, R.C. **Biodiversidade de leveduras associadas a polpas de frutas da região nordeste do Brasil**. Belo Horizonte, 2001. 87 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

TRINDADE, R.C., RESENDE, M.A, PIMENTA, R.S., LACHANCE, M.A., ROSA, C.A., *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek** v.86, p.27-32, 2004.

TRINDADE, RITA C. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and applied microbiology**, v. 25, n. 2, p. 294-300, 2002.

UENOJO, MARIANA; PASTORE, GLAUCIA MARIA. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388, 2007.

VALENTE, P., BOEKHOUT, T., LANDELL, M. F., CRESTANI, J., PAGNOCCA, F. C., SETTE, L. D. & VAINSTEIN, M. H. *Bandoniozyma* gen. nov., a genus of fermentative and non-fermentative tremellaceous yeast species. 2012.

VALENTE, P.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.45, p. 949-958, 1999.

VIEIRA, E. M., JORGE, R. V., FIQUEIREDO, J. C. G., & NOBRE, S. A. M. Prospecção de actinomicetos endofíticos em espécies nativas do cerrado. 8º Fórum FEPEG do dia 24 a 27 setembro. UNIMONTES-MONTES CLAROS, 2014.

VILELA, D. M. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca**. Lavras, 2011. 80 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras – UFLA.

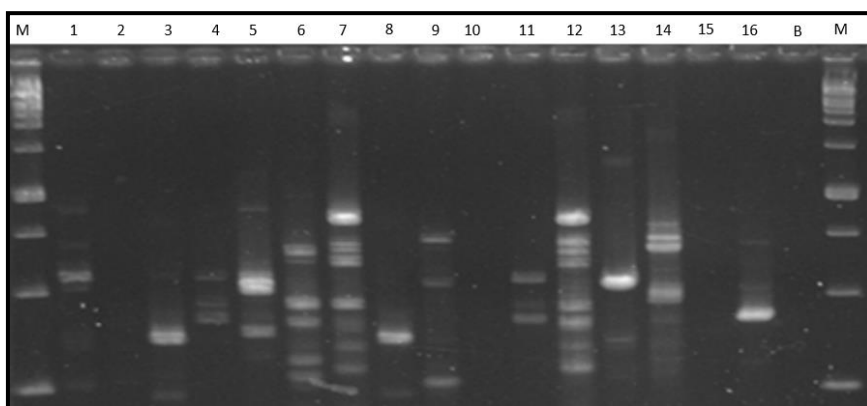
WANG LW, ZHANG YL, Lin FC, Hu YZ, Zhang CL. Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. **Mini Rev Med Chem** 11(12):1056–1074, 2011.

YANG, QINGXIANG et al. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. **Bioresource technology**, v. 129, p. 264-273, 2013.

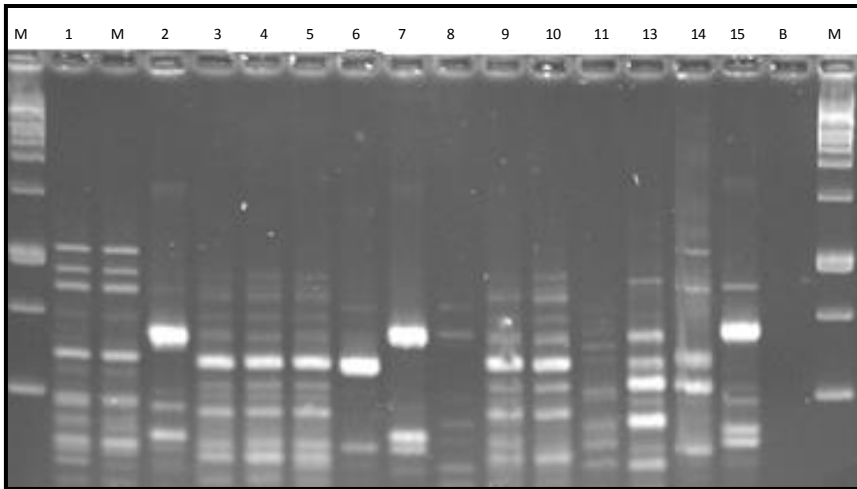
8- ANEXOS

Anexo 1: Tabela de composição dos meios para testes enzimáticos (SOUZA, 2008)

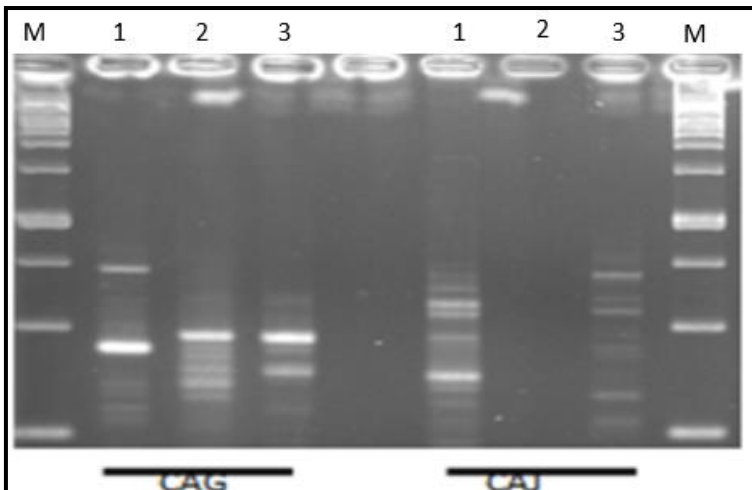
Meios sólidos g L ⁻¹	Enzima	Tampão	Revelador	pH
Meio amido - 18g de agar, 10 g de amido	Amilase	Citrato fosfato 0,1 M	Iodo 0,1 M	5
Meio CMC - 18g de agar, 10 g de Carboximetilcelulose	Celulase	Acetato de Na ⁺ 0,1 M	Vermelho congo 0,1 %	5
Meio pectinase - 18g de agar, 10 g de pectina	Pectinase	Acetato de Na ⁺ 0,1 M	Ácido Clorídrico 5N	5
Meio agar-gelatina-leite - 18g de agar, solução de gelatina 10% e solução de leite em pó 10%	Proteinase	Citrato fosfato 0,1 M	Nenhum	5



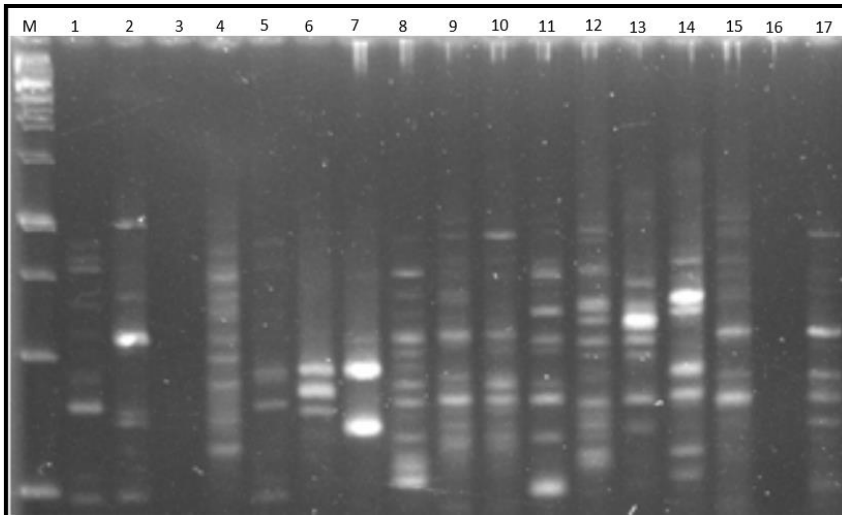
Anexo 2: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de Pequi. A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos



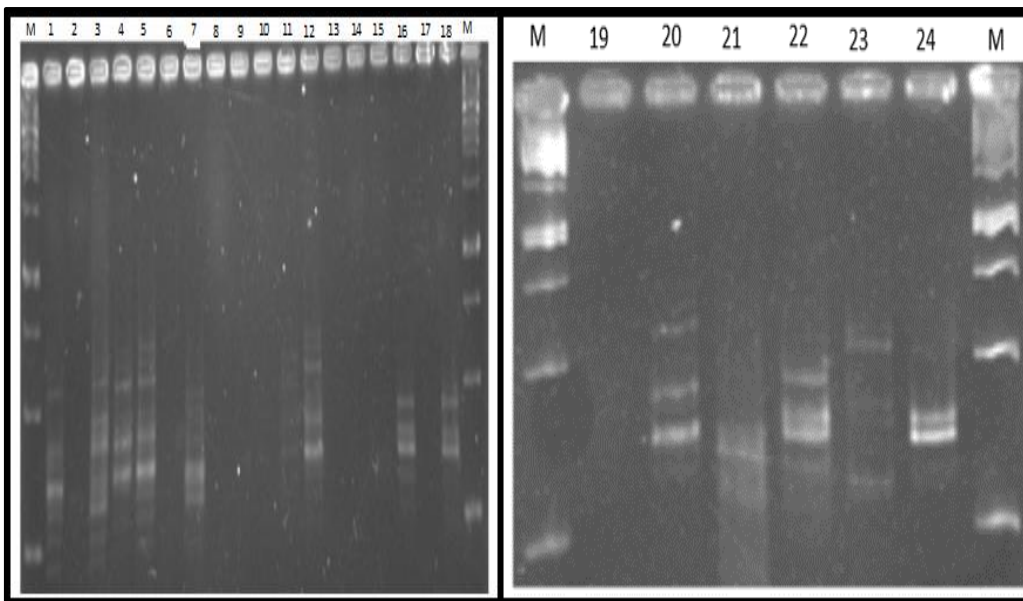
Anexo 3: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de coco guariroba A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.



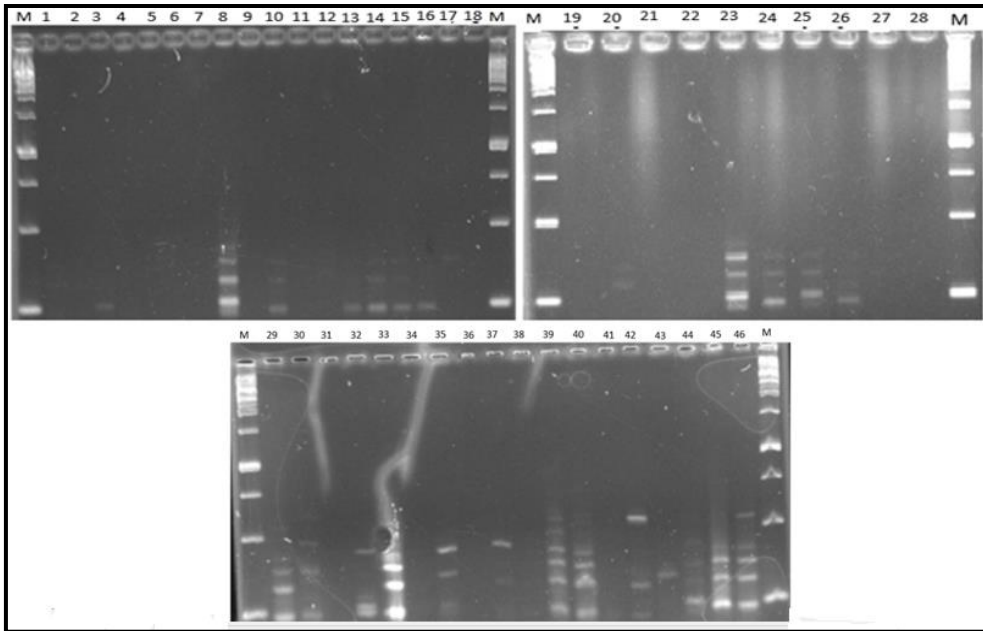
Anexo 4: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de cagaita e caju. A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.



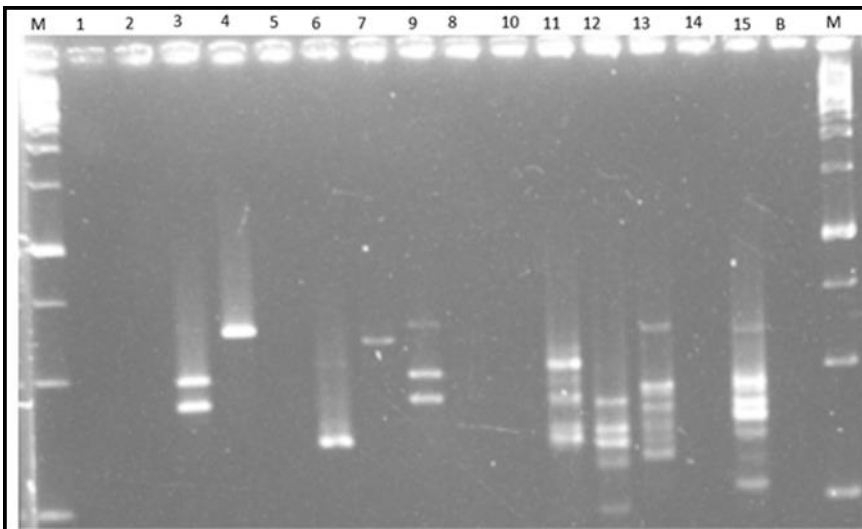
Anexo 5: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de mangaba. A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.



Anexo 6: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de araticum. A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.



Anexo 7: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de coquinho-azedo. A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.



Anexo 8: Perfis eletroforéticos baseados em fragmentos de DNA de isolados de leveduras de araçá . A letra M indica o marcador para servir como referência para o tamanho dos fragmentos.

