

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E  
DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE  
FILOPLANO DO *Hibiscus rosa-sinensis***

Alexandre Meneghello Fuentefria  
Farmacêutico – UFRGS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Novembro, 2004

## AGRADECIMENTOS

Em especial a Prof. Patrícia Valente, por toda a confiança e liberdade neste projeto de pesquisa, por ter sido antes de tudo uma verdadeira amiga, sempre me mostrando o melhor caminho e, sobretudo, pelo privilégio de ter trabalhado contigo neste laboratório desde o início “de tudo”.

Às alunas de iniciação científica Inélia Franskoviaki e de iniciação técnica Luisa Mercado, o meu muito obrigado, pela amizade, pela lição de coleguismo e espírito de grupo, tornando o laboratório o “nosso” laboratório. Espero ter contribuído na formação de vocês, tanto quanto vocês representaram para a minha.

Às colegas de laboratório Melissa Landell, Juliana Mautone, Cláudia Hartfelder e Andréia Spanemberg pela amizade e por tornarem este laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

À Roberta Bussamara, pelo grande exemplo de colega, amiga e profissional e, por termos feito desses últimos meses de pesquisa uma exemplar forma de trabalhar em dupla.

À Prof. Marilene H. Vainstein por ter me propiciado o convívio no laboratório de Fungos de Importância Médica e poder compreender um pouco mais deste “mundo molecular”.

Com muito carinho à Cristiane da Rosa Moraes pelo companheirismo e apoio, e por ter estado em todos os momentos ao meu lado, sempre com muito amor e dedicação.

À minha família pelo apoio incondicional e constante.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPERGS, pelo apoio financeiro ao projeto.

Sobretudo à Deus, sem o qual nada seria possível.

# IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DO FILOPLANO DO *Hibiscus rosa-sinensis*

Autor: Alexandre Meneghello Fuentefria

Orientador: Dra. Patrícia Valente

## <sup>1</sup>RESUMO

O filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis* abriga uma enorme biodiversidade de leveduras e fungos semelhantes a leveduras cujo potencial biotecnológico ainda é desconhecido. Foram isoladas 84 cepas de leveduras de filoplano desta planta, sendo identificadas pela metodologia clássica. Do total de isolados 37% são de afinidade ascomicética, 36% de afinidade basidiomicética e 27% de fungos semelhantes a leveduras. Duas leveduras micocinogênicas (“killer”) com espectro antagonista contra leveduras patogênicas de interesse epidemiológico foram encontradas. *Kodamaea ohmeri* HB55 e *Kodamaea ohmeri* HB88 são fortes candidatas a estudos de purificação e caracterização genética da toxina secretada, ativa contra isolados clínicos e ambientais de todas as variedades de *Cryptococcus neoformans* e também contra algumas espécies patogênicas de *Candida*. O tradicional procedimento de seleção ou triagem para obter-se novos microrganismos produtores de enzimas para fins biotecnológicos foi executado neste trabalho. As 84 linhagens foram avaliadas na sua capacidade de produzir amilase, proteases (caseinase e gelatinase), celulase, celobiase, xilanase, esterase e lipase. Trinta e um isolados foram selecionados: 5 linhagens produtoras de celulase, 3 de xilanase, 4 de amilase, 5 de protease, 1 de lactase, 2 de esterase, 6 produtoras de celulase e xilanase e, por fim, 5, produtoras de amilase, celulase e lipase. A cepa HB85A, presuntivamente identificada como *Itersonilia perplexans*, apresentou excelente perfil lipolítico sendo encaminhada ao Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul para processos de otimização da produção de lipase.

---

<sup>1</sup> Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (122p). Novembro, 2004.

## IDENTIFICATION AND EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF YEAST AND YEAST-LIKE FUNGI ISOLATED FROM THE PHYLLOPLANE OF *HIBISCUS ROSA-SINENSIS*

Author: Alexandre Meneghello Fuentefria

Advisor: Dra. Patrícia Valente

### <sup>2</sup>ABSTRACT

The phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* supports an abundant biodiversity of yeast and yeast-like fungi whose biotechnological potential is still unknown. A total of 84 yeast and yeast-like strains were isolated from the phylloplane of this plant and identified by the classic methodology. Of these, 37% were of ascomycetic affinity, 36% of basidiomycetic affinity and 27% of yeast-like fungi. Two killer yeasts with antagonistic spectrum against pathogenic yeasts of epidemiological interest were found. *Kodamaea ohmeri* HB55 and *Kodamaea ohmeri* HB88 are strong candidates for studies of purification and characterization of the killer toxin, active against environmental and clinical isolates of the three varieties of *Cryptococcus neoformans*, and against some pathogenic species of *Candida*. The traditional procedure of selection or screening to discover new enzyme-producing microorganisms for biotechnological applications was performed in this work. The 84 isolates were evaluated in their capacity to produce amylase, proteases (caseinase and gelatinase), cellulase, cellobiase, xylanase, esterase and lipase. Thirty one strains were selected: 5 isolates producing of celulase, 3 of xilanase, 4 of amilase, 5 of protease, 1 of lactase, 2 of esterase, 6 producers of celulase and xilanase e, finally, 5, producers of amilase, celulase and lipase. The strain HB85A, presumptively identified as *Itersonilia perplexans*, showed excellent lipolytic profile, and was directed to the Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul for optimization of the production of lipase.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (122p). November, 2004.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
RELAÇÃO DE TABELAS.....	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	3
2.2 Potencial biotecnológico de leveduras.....	6
2.2.1 Produção de enzimas de interesse industrial.....	8
2.2.2 Produção de micocinas (toxinas “killer”).....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Isolamento e purificação das culturas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	21
3.2 Manutenção das culturas.....	22
3.3 Taxonomia convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like fungi”).....	23
3.3.1 Observação macromorfológica.....	23
3.3.1.1 Características morfológicas coloniais .....	23
3.3.1.2 Demonstração de balistosporos.....	24
3.3.2 Observação micromorfológica.....	25
3.3.2.1 Características morfológicas da célula leveduriforme.....	25
3.3.2.2 Verificação da formação de ascósporos.....	25
3.3.2.3 Técnica de microcultivo em lâmina.....	26
3.3.3 Testes bioquímicos.....	27
3.3.3.1 Testes de Fermentação.....	27
3.3.3.2 Teste de assimilação de fontes de carbono.....	28
3.3.3.3 Teste de assimilação de fontes de nitrogênio.....	29
3.3.4 Testes fisiológicos.....	31
3.3.4.1 Teste com Agar uréia de Christensen.....	31
3.3.4.2 Testes de crescimento em diferentes temperaturas.....	32
3.3.4.3 Teste de tolerância ao caldo YEPG com NaCl 10% e 16% .....	32
3.3.4.4 Teste de tolerância à glicose 50%.....	33
3.3.4.5 Teste de produção extracelular de compostos amilóides.....	33
3.4 Avaliação do potencial biotecnológico.....	34
3.4.1 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático extracelular.....	34
3.4.1.1 Produção de lipase.....	34
3.4.1.2 Produção de esterase.....	35
3.4.1.3 Produção de celulase.....	35
3.4.1.4 Produção de caseinase.....	36
3.4.1.5 Produção de gelatinase.....	36
3.4.1.6 Produção de amilase.....	37
3.4.1.7 Produção de celobiase e $\beta$ -galactosidase (lactase).....	37
3.4.1.8 Produção de xilanase.....	38
3.4.2 Produção de substâncias antimicrobianas.....	38

3.4.2.1 Culturas patogênicas.....	38
3.4.2.2 Teste para detectar linhagens com fenótipo “killer” (produtoras de micocinas).....	39
3.4.2.3 Avaliação da atividade “killer” de linhagens selecionadas em diferentes meios de cultura.....	40
3.4.2.4 Confirmação da atividade micocinogênica.....	41
3.4.2.5 Teste de cura do fenótipo “killer”.....	41
3.5 Listagem de equipamentos.....	41
3.6 Listagem dos meios de cultura utilizados.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Isolamento e purificação das culturas leveduriformes.....	44
4.2 Identificação fenotípica das leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	45
4.2.1 Testes morfológicos.....	48
4.2.2 Testes bioquímicos e fisiológicos.....	48
4.3 Taxonomia molecular de leveduras.....	66
4.3.1 Sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA.....	66
4.4 Avaliação semi-quantitativa do perfil enzimático extracelular.....	66
4.5 Detecção de substâncias antimicrobianas.....	83
4.5.1 Avaliação da atividade micocinogênica de linhagens selecionadas contra leveduras patogênicas ao homem.....	92
4.6 Teste de cura do fenótipo “killer”.....	94
5. CONCLUSÕES.....	99
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
8. APÊNDICES.....	112
8.1 Taxonomia molecular de leveduras.....	112
8.1.1 Sequência completa dos segmentos D1/D2 do gene 26S do isolado HB88 ( <i>Kodamaea ohmeri</i> ).....	114
8.1.2 Sequência completa dos segmentos D1/D2 do gene 26S do isolado HB55 ( <i>Kodamaea ohmeri</i> ).....	114
8.2 Preparo de reagentes.....	115
8.3 Doseamento da atividade lipolítica das linhagens selecionadas.....	116
VITA.....	120

## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1:	Listagem dos equipamentos utilizados.....	42
Tabela 2:	Listagem dos meios de cultura utilizados.....	43
Tabela 3:	Listagem e identificação presuntiva das culturas de leveduras isoladas do filoplano do <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	46
Tabela 4:	Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	49
Tabela 5:	Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	54
Tabela 6:	Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	60
Tabela 7:	Perfil enzimático extracelular das culturas de leveduras isoladas de filoplano de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> .....	67
Tabela 8:	Seleção de linhagens micocinogênicas em meio YM-MB.....	86
Tabela 9:	Atividade “killer” das linhagens <i>Kodamaea ohmeri</i> HB55, <i>Kodamaea ohmeri</i> HB88 e <i>Aureobasidium pullulans</i> HB64 contra leveduras patogênicas humanas em Agar YEPG e Agar YM-MB em diferentes valores de pH.....	95
Tabela 10:	Atividade micocinogênica da <i>Kodamaea ohmeri</i> HB55 e HB88 contra diferentes variedades de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	97

**RELAÇÃO DE FIGURAS**

Figura 1:	Percentagem absoluta do perfil enzimático extracelular avaliado nas linhagens isoladas.....	73
Figura 2:	rDNA em eucariontes, segundo Reeder (1989).....	113
Figura 3:	Determinação da enzima lipase com palmitato de p-nitrofenil (pNPP-Sigma).....	117
Figura 4:	Determinação da caseinase pelo método colorimétrico da azocaseína .....	118
Figura 5:	Perfil da atividade específica de lipase por hora de fermentação.....	119



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**CBS:** Centralbureau voor Schimmelcultures, Holanda

**CBiot:** Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

**cm:** Centímetro

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**HB:** *Hibiscus*

**IMUFRJ:** Coleção de culturas de leveduras do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ

**mM:** Milimolar

**μL:** Microlitro

**mL:** Mililitro

**μg:** Micrograma

**NRRL:** Coleção de culturas ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, USA

**pH:** Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

**rpm:** Rotações por minuto

**RNA:** Ácido ribonucléico

**S:** Sevdberg, unidade de sedimentação

**UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**UFRJ:** Universidade Federal do Rio de Janeiro

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras têm sido usadas pelo homem em processos fermentativos há mais de 8.000 anos. Apesar da predominância do uso da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, outras leveduras já demonstraram potencial para utilização na indústria química, farmacêutica, têxtil e alimentícia. Uma das áreas onde este potencial pode ser verificado é na produção de enzimas, tanto diretamente, através do uso do próprio microrganismo em processos fermentativos, como indiretamente através do conhecimento de seqüências gênicas de microrganismos que podem servir como fonte para modificações genéticas. Outra importante aplicação é na utilização das substâncias antimicrobianas produzidas por estes fungos para a produção de novos antibióticos no combate de espécies patogênicas de microrganismos, em especial de leveduras.

A diversidade de leveduras no filoplano tem sido muito estudada devido às interações ecológicas dentre as diversas espécies presentes nesse rico substrato. Entretanto, a avaliação das características biotecnológicas que

essas linhagens possam oferecer não estão sendo exploradas. Baseado nesse contexto, e seguindo relatos da ampla diversidade de leveduras estudadas até o momento em flores da planta ornamental *Hibiscus rosa-sinensis*, buscou-se identificar e avaliar o potencial biotecnológico de linhagens de leveduras e também de fungos semelhantes a leveduras associadas à superfície foliar (filoplano) desse arbusto.

Com base nos parâmetros da hipótese apresentada acima, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Identificar as leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.
- Detectar a presença de leveduras micocinogênicas (leveduras “killer”) dentre os isolados e testar sua atividade contra leveduras patogênicas ao homem.
- Selecionar linhagens produtoras de enzimas de interesse biotecnológico e encaminhá-las para testes de otimização da produção enzimática.
- Depositar as linhagens na Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras

As leveduras são organismos pertencentes ao reino *Fungi*, possuindo características típicas dos fungos como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), aclorofilados, nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, e ausência de motilidade, entre outras. Elas se diferenciam dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman e Fell, 1998). Os microrganismos considerados como leveduras são encontrados nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos, anteriormente denominados Deuteromycetes (sem reprodução sexuada conhecida), constituindo um grupamento artificial (Hawksworth *et al.*, 1995). Geralmente são encontrados em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares. Mas também podem ser isolados do ar, do solo,

de águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos (Do Carmo-Souza, 1969).

A maioria das espécies de leveduras basidiomicéticas possui um perfil assimilativo amplo de fontes de carbono quando comparadas com as leveduras ascomicéticas, que se restringem a poucas fontes de carbono (Kutzman & Fell, 1998). As leveduras basidiomicéticas são ricamente encontradas em substratos que possuam componentes mais complexos, como folhas e solo, ao contrário das leveduras ascomicéticas, que são freqüentemente encontradas em substratos ou fontes ricas em açúcares simples, como frutos (Santos *et al.*, 1997).

Apesar da presença de leveduras na superfície externa de folhas (filoplano) ser um fato conhecido, poucos estudos têm sido realizados visando a avaliação do potencial biotecnológico destas leveduras. A maioria das espécies encontradas pertence a leveduras de afinidade basidiomicética e às chamadas leveduras pretas, sendo que grande parte apresenta pigmentação e produção de cápsula mucóide (Last e Price, 1969). Provavelmente, a presença de pigmentos carotenóides é um fator de proteção contra a luz solar e a cápsula serve para evitar a desidratação, que é um risco sério neste habitat, e facilitar a fixação ao substrato. Segundo Bab'eva e Chernov (1995), essas leveduras possuem outras características que favorecem a permanência na superfície de folhas, tais como produção de clamidosporos resistentes à dessecação e de balistosporos (esporos que são lançados a distância e que podem ser dispersados pelo vento).

Os gêneros de leveduras mais comumente encontrados associados ao filoplano são *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida* (Robbs, 1986; Bab'eva e Chernov, 1995; Li *et al.*, 1995). A presença de espécies de afinidade ascomicética tem sido pouco relatada na literatura, porém *Debaryomyces hansenii* foi encontrada como a levedura dominante em filoplano de diversas plantas nas Ilhas Canárias (Middelhoven, 1997). Segundo Do Carmo-Souza (1969), as espécies de leveduras capazes de utilizar grande variedade de compostos são mais frequentemente encontradas no filoplano, já que as fontes de carbono simples estão presentes em concentrações muito baixas. Já foi notada a variação da população de leveduras com a estação do ano (Di Menna, 1962; Last, 1955; Miller, 1979). É provável que isto ocorra não somente por causa do aumento da idade da folha (Last, 1955), mas também pela alteração das condições atmosféricas, principalmente o aumento da intensidade das chuvas.

*Hibiscus rosa-sinensis*, popularmente chamado de mimo de Vênus, é uma planta da família *Malvaceae* descrito como um arbusto lenhoso de 3 a 5 metros de altura que possui diversos híbridos de flores simples ou dobradas, em cores variadas. Apesar de planta tropical, a espécie tem sido usada até na arborização de ruas de cidades frias do sul do Brasil, como Porto Alegre e Curitiba. O popular hibisco encontrado nos jardins, praças e ruas é uma mistura de diversas espécies compatíveis da Ásia, Austrália e ilhas do Pacífico. Flores e folhas do *Hibiscus* são também comumente utilizadas em infusões, sendo indicado como adstringente ou expectorante (Panizza, 1998). A escolha dessa espécie de planta vêm de acordo com recentes pesquisas de novas espécies

de leveduras isoladas das flores de diversas espécies nativas de *Hibiscus* na Austrália e Hawaii (Lachance *et al.*, 1998; Lachance *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2003). Embora estudos de leveduras em flores desse arbusto já sejam desenvolvidos há uma década, a pesquisa envolvendo a biodiversidade de leveduras associadas ao filoplano e a aplicação biotecnológica desses isolados é uma novidade.

## **2.2 Potencial biotecnológico de leveduras**

Um esquema geral de um programa de triagem de microrganismos com potencial para uso industrial é composto por diferentes etapas que, de uma forma geral, se iniciam com a seleção do microrganismo que possui a característica desejada (Steele & Stowers, 1991). Essa seleção pode ser realizada a partir de coleções de culturas ou a partir de substratos naturais presentes no meio ambiente. A estratégia utilizada para a seleção pode variar. Idealmente, deve-se estabelecer qual o produto ou atividade microbiana desejada antes do início do programa de seleção, porém a observância desta norma nem sempre é aconselhável. Em especial, caso o objetivo seja isolar microrganismos que possuam diferentes capacidades para uso biotecnológico, como, por exemplo, capacidade de produzir diferentes enzimas, uma estratégia indireta de isolamento é normalmente adotada. Nesta estratégia, procede-se ao isolamento geral de microrganismos da amostra, que depois são testados com relação à capacidade de gerar os produtos ou as atividades desejadas. Desta forma, possibilita-se a criação de coleções de cultura de microrganismos que possam, posteriormente, ser testadas para a verificação de outras

características de interesse industrial. Após esta primeira etapa de seleção do microrganismo, é realizada a otimização do processo de produção para posterior utilização em larga escala.

A procura de novos microrganismos com potencial biotecnológico, representada pela etapa inicial de seleção, não se restringe apenas ao isolamento de cepas que possam ser posteriormente melhoradas para otimização da produção, mas engloba também a procura de seqüências gênicas responsáveis por características interessantes industrialmente. Embora a manipulação genética por técnicas de mutação e tecnologia do DNA recombinante seja freqüentemente usada para aumentar o nível de expressão de um grande número de produtos microbianos, procedimentos tradicionais de seleção ou triagem para obter-se novos microrganismos produtores de moléculas bioativas para fins biotecnológicos na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil e química continuam a ser imprescindíveis (Strauss *et al.*, 2001; Buzzini & Martini, 2002). Segundo Steele & Stowers (1983), produtos oriundos de microrganismos de ocorrência natural apresentam a vantagem de serem mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização que os produzidos por microrganismos manipulados geneticamente. Por esta razão muitas indústrias são favoráveis à seleção de microrganismos de ocorrência natural.



### **2.2.1 Produção de enzimas de interesse industrial**

Como todas as outras proteínas, as enzimas se formam por cadeias longas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas, porém são biocatalisadores, facilitando reações bioquímicas sem se deixarem consumir na reação. Estão envolvidas em todos os processos naturais, para processar nutrientes, produzir energia, dar destino a produtos residuais e regular grande variedade de outras funções metabólicas. Certas enzimas são altamente específicas, outras controlam um amplo conjunto de reações. As enzimas são divididas em categorias de acordo com os compostos sobre os quais agem ou com o tipo de reação que controlam, recebendo quase sempre no nome o sufixo '-ase'. A celulase, por exemplo, decompõe a celulose, a protease converte proteínas em aminoácidos, a lipase decompõe lipídeos e gorduras em glicerol e ácidos graxos e, a amilase, decompõe amido em açúcares simples. Fungos produzem uma ampla variedade de enzimas, algumas em pequenas quantidades, mas suficientes para os processos bioquímicos envolvidos na célula. Estas enzimas são usualmente capazes de digerir nutrientes ou substratos insolúveis como a celulose, o amido e proteínas, para que sejam utilizados nos diversos compartimentos metabólicos intracelulares e transformados em unidades fundamentais de crescimento (Stryer, 1995).

Uma grande variedade de segmentos industriais utiliza enzimas amilolíticas de origem microbiana para converter o amido em unidades fundamentais de glicose. O amido é formado por dois tipos de polímeros amiláceos: a amilose, que é um polímero linear constituído de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e a amilopectina, que é formada por cadeias

curtas de amilose ligadas entre si de modo a formar uma estrutura ramificada unidas por ligações  $\alpha$ -1,6. As amilases de origem microbiana podem ser subdivididas em exoamilases e endoamilases (Moreira *et al.*, 1999). Dentre as exoamilases destacam-se a  $\alpha$ -amilase (1,4  $\alpha$ -glicanohidrolase) e a glicoamilase (1,4  $\alpha$ -glicanoglicohidrolase). Dentre as endoamilases encontra-se a  $\beta$ -amilase (1,4  $\alpha$ -glicanomaltosidase) e a pululanase secretada por *Aureobasidium pullulans*, capaz de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,6 (Yurlova & de Hoog, 1997). Estas enzimas são comumente encontradas em fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus*, que são freqüentemente usadas como fonte industrial de amilases. Apesar da produção ser obtida principalmente a partir de linhagens de fungos filamentosos, várias espécies de leveduras têm sido relatadas com capacidade de degradação do amido, podendo ter alguma aplicação industrial direta ou indireta (Gundllapalli *et al.*, 2002). As  $\alpha$ -amilases fúngicas são utilizadas em processos de panificação e em rações para melhorar a digestão. Atuam na faixa de 55°C e em pH ácidos (5,0 a 5,5), ao contrário das  $\alpha$ -amilases bacterianas, que são termoestáveis nas temperaturas de 90 a 110°C em pH 6, sendo utilizadas na produção de xaropes, bebidas e na indústria têxtil (Bowles, 1996; Moreira *et al.*, 1999).

Glicerol-éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) ou lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases. Seus substratos naturais são triglicerídeos presentes na interface óleo-água, ou seja, são mais específicas para substratos insolúveis na forma de emulsão, produzindo ácidos graxos livres e monoglicerídeos (Carvalho *et al.*, 2003). Seu modo de ação se assemelha ao das esterases, mas diferem por apresentarem maior afinidade

por ácidos graxos de cadeia longa. Ao contrário das lipases, as esterases apresentam grande atividade sobre substratos solúveis em água (Ionita *et al.*, 1997). As lipases e as esterases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização, conferindo a estas enzimas um potencial enorme de aplicações. As lipases são produzidas por plantas, animais ou microorganismos, entre eles se destacando as leveduras e os fungos filamentosos. As razões do enorme potencial biotecnológico das lipases devem-se a sua alta estabilidade em solventes orgânicos; por não requererem a presença de co-fatores; por possuírem uma larga especificidade pelo substrato e por exibirem uma alta enantiosseletividade (Carvalho *et al.*, 2003). Apesar da maioria das lipases serem utilizadas em sua forma solúvel, devido à necessidade de se aumentar a economia em processos tecnológicos (via reutilização da enzima por mais de uma única passagem pelo reator) e a diminuição da contaminação do produto (via confinamento da enzima em um suporte), tem sido cada vez mais implementada a imobilização dessa enzima (Paiva *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001). Embora as aplicações industriais das lipases atualmente estejam focadas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química, de alimentos, petroquímica, couro, papel e no tratamento de resíduos industriais (Gandhi, 1997). Na indústria petroquímica, o biodiesel, uma alternativa ao diesel, é produzido através de fontes biológicas renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. É biodegradável, não tóxico e tem baixa emissão de poluentes, beneficiando com isso, o meio ambiente (Frangui & Milford, 1999). Na indústria alimentícia, a hidrólise

seletiva da gordura do leite é um outro exemplo de aplicação potencial de lipases, devido ao aumento da demanda por leite e derivados com menor teor de gordura. A lipase também é responsável pela formação do aroma distinto em queijos do tipo Cheddar e pela produção de substitutos da manteiga e outros aditivos usados na manufatura de doces (Gandhi, 1997). Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica das lipases, vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura ativa vem sendo propostos. A engenharia genética de lipases, por exemplo, envolve o isolamento e superexpressão de genes de interesse em microrganismos produtores dessa enzima, sendo muito estudada nos últimos anos (Fickers *et al.*, 2003). São por estes motivos que microrganismos, em particular leveduras altamente produtoras desta enzima, são procurados por centros de pesquisa em todo o mundo.

As esterases, por sua vez, possuem aplicações diretas nas indústrias de química fina e farmacêutica, como, por exemplo, na resolução de misturas racêmicas nos processos de modificações estruturais em moléculas de drogas, na síntese de flavorizantes para a indústria de alimentos e na modificação de triglicerídeos para a indústria de óleos. Embora as esterases possuam importantes aplicações industriais, uma importante limitação na propriedade físico-química desta enzima impede o seu uso em larga escala na indústria: as esterases são termolábeis, principalmente em altas temperaturas, prejudicando a maioria dos processos químicos industriais (Kademi *et al.*, 1999; Molinari *et al.*, 1996). Por esse motivo, a busca de esterases termoestáveis de origem microbiana são uma importante fonte para o desenvolvimento de novas

aplicações desta enzima. Uma discordância entre autores ainda persiste sobre a específica denominação da atividade enzimática sobre os substratos Tween 20 (Laurato de Sorbitan Etoxilado 20) e Tween 80 (Monooleato de sorbitan etoxilado), quando estes são utilizados como meios de triagem para a atividade enzimática para fins biotecnológicos. Alguns grupos de pesquisa afirmam que a enzima esterase utiliza como substrato ambos compostos (Rudek, 1978), outros alegam que a sensibilidade e especificidade do tween 20 como substrato é mais significativa como teste de triagem dessa enzima (von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989; Ionita *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2002) e, por fim, alguns autores alegam que atividade sobre Tween 80 refere-se a esterase e não lipase, devido ao tamanho da cadeia de carbono (Aktas *et al.*, 2002; Yucesoy & Marol, 2003). Em virtude dessa falta de uniformidade neste assunto, nós utilizamos a prerrogativa que atividade enzimática sobre os substratos tween 20 e tween 80 são lipase e esterase, respectivamente (von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989; Ionita *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2002).

As proteases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. Essas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (Braga *et al.*, 1998). Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. A impossibilidade das proteases de células eucarióticas superiores atenderem à demanda industrial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos são um excelente recurso de proteases devido

a sua grande diversidade bioquímica e possibilidade de manipulação genética. A degradação das proteínas é iniciada por proteases (endopeptidases) secretadas pelos microrganismos, seguida da posterior hidrólise por peptidases (exopeptidases). As proteases são de grande valor comercial, e são amplamente utilizadas nas indústrias biotecnológicas. Na indústria de alimentos são usadas nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais como o molho soyo, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja e na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis neles contidas em altas concentrações (Rao *et al.*, 1998). As proteases são também empregadas na produção de derivados lácticos como os queijos, atuando na maturação e desenvolvimento da textura e sabor, devido à ação das proteases na beta-caseína do leite (Visser, 1993). Nos últimos anos, pesquisas têm revelado que muitas leveduras produzem quantidades significantes de proteinases extracelulares, ao contrário do que antes se achava, devido principalmente que a maioria dos estudos sobre aplicações industriais eram somente na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que secreta pouca ou nenhuma proteinase extracelular (Zarzoso *et al.*, 1998). As proteases de leveduras são relevantes em biotecnologia e também do ponto de vista médico, pois essas enzimas têm sido consideradas um importante fator de virulência para esses organismos, podendo também ser usadas como antígeno em métodos de diagnóstico, principalmente nas manifestações de candidíases (Rao *et al.*, 1998).

A celulose é uma fonte de carbono renovável considerada como o mais abundante substrato orgânico existente para a produção de glicose,

combustível e insumos para indústria alimentícia, sendo freqüentemente encontrado associado a hemicelulose, lignina e outros polissacarídeos. A celulose é um polímero de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 que podem ser hidrolisadas por enzimas celulolíticas. O método químico convencional para obtenção da celulose consiste basicamente na transformação da madeira em um material fibroso, denominado pasta, polpa ou celulose industrial, sendo em seguida submetida a processos de depuração do material (Lynd *et al.*, 2002). Nas últimas décadas, tem aumentado progressivamente a pesquisa de microrganismos produtores de celulase para a hidrólise enzimática da celulose em glicose, servindo como uma importante alternativa para os métodos convencionais empregados na indústria (Lynd *et al.*, 2002). O dissacarídeo celobiose é o principal produto da degradação da celulose. A degradação total da celulose é catalisada por um complexo de enzimas denominado celulase, composto por  $\beta$ -1,4-glicanases e  $\beta$ -glicosidase, podendo ter dois padrões de clivagem: as endoglicanases, que quebram a cadeia de celulose internamente, enquanto as exoglicanases quebram externamente, ambas resultando na formação de celobiose. Celobiose são duas unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. A degradação da celobiose pela celobiase ( $\beta$ -glicosidase) resulta na formação de glicose (Atlas & Bartha, 1997), sendo uma das etapas da transformação da celulose em um açúcar fermentável, com inúmeras aplicações industriais.

Após a celulose, as hemiceluloses são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza, ocorrendo nas paredes celulares das plantas, sendo constituídas por polímeros lineares ou ramificados, contendo de

dois a seis diferentes açúcares ou seus derivados. Para uma completa e eficiente degradação das hemiceluloses há necessidade de um sistema de enzimas. Uma dessas enzimas é a xilanase, responsável pela degradação da xilana, principal hemicelulose das plantas (Beg *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2001). A xilana consiste de uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Coughlan & Hazlewood, 1993). Nas últimas décadas aumentou o interesse industrial pelas enzimas fúngicas que promovem a degradação ou branqueamento das xilanas. Na indústria, as xilanases são produzidas principalmente pelos fungos filamentosos (Haltrich *et al.*, 1996). Na indústria de papel e celulose, as enzimas xilanolíticas, quando livres de celulases, auxiliam no branqueamento da polpa facilitando a remoção da lignina, podendo ser aplicadas para modificar a polpa na formação do papel ou ainda serem utilizadas na reciclagem do papel. Estas enzimas, em associação com celulases, podem ser utilizadas para aprimorar o processo de extração de óleos vegetais, na clarificação de sucos de frutas e vinhos, na fabricação de café solúvel, no aumento do teor nutricional da silagem, no melhoramento da reidratação de vegetais secos e de textura dos derivados lácteos (Kulkarni *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2001).

Lactose, o componente de maior concentração no leite e soro, possui limitada utilização em produtos alimentícios e farmacêuticos, devido aos indivíduos intolerantes à lactose. Por esta razão, a lactose é freqüentemente hidrolisada antes do uso. A má digestão da lactose em recém-nascidos deve-se a uma redução geneticamente determinada de  $\beta$ -galactosidase (lactase) no intestino delgado, provocando sintomas gastrointestinais devido à fermentação



da lactose por bactérias do cólon (Becerra *et al.*, 2001). A redução ou eliminação de leite e derivados do leite da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteína, riboflavina e cálcio. Desta forma, buscam-se alternativas para não eliminar o leite da dieta. A adição de  $\beta$ -galactosidase ao leite para pré-hidrolisar a lactose é uma das mais importantes alternativas (Vasiljevic & Jelen, 2001). A lactase ( $\beta$ -galactosidase) é a enzima responsável pela clivagem da lactose e de outros  $\beta$ -galactosídeos. Embora possa ser encontrada em plantas e animais, as melhores fontes para uso industrial são os microrganismos. Além disso, é uma enzima largamente utilizada na indústria de alimentos para evitar a cristalização da lactose em preparados como sorvete e leite condensado e no preparo de soluções enterais para indivíduos intolerantes à lactose (Rings *et al.*, 1994).

### **2.2.2 Produção de micocinas (“Toxinas killer”)**

Leveduras com fenótipo micocinogênico secretam proteínas ou glicoproteínas (toxinas “killer” ou micocinas) que são inibitórias para células sensíveis de outras leveduras, podendo ou não ser do mesmo gênero, sem o contato direto célula-célula, mas com um mecanismo específico que atua em receptores da parede e membrana celular da célula sensível. As cepas micocinogênicas são imunes para o efeito de sua própria toxina, mas podem ser suscetíveis a toxinas produzidas por outras cepas micocinogênicas (Schmitt & Breinig, 2002). No habitat natural, esta toxina pode conferir uma grande vantagem na competição com leveduras sensíveis por limitar o acesso a nutrientes disponíveis no substrato (Ganter & Starmer, 1992; McCormack *et al.*,

1994; Fredlund *et al.*, 2002; Zagorc *et al.*, 2001), embora o seu papel em ambientes naturais não esteja bem elucidado. É um mecanismo de competição podendo causar a exclusão imediata de indivíduos ou populações sensíveis (Abranches, 1997). O papel ecológico do fenótipo “killer” tem sido extensivamente estudado em comunidades de leveduras associadas a frutos, apresentando-se como o mais importante habitat para leveduras micocinogênicas, visto que um quarto das cepas isoladas demonstra possuir a característica inibidora (Magliani *et al.* 1997). Quanto ao modo de ação, vários mecanismos têm sido propostos: aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática provocando sua ruptura com perda de íons potássio e ATP; inibição da síntese do DNA; bloqueio do ciclo celular na fase G1; atividade da quitinase e, por fim, inibição da síntese da  $\beta$ -1,3-glicana (Castoria *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002). A diferença entre esses mecanismos depende da base genética do sistema “killer” (cromossômico, plasmidial ou codificado por RNA associado a partículas virais), do tamanho do genoma, da conformação da toxina (monômeros ou dímeros) e do tipo de receptor específico ( $\beta$ -1,6-D-Glicana;  $\alpha$ -1,3-Manose ou quitina) (Magliani *et al.*, 1997).

O fenótipo “killer” foi observado pela primeira vez em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por Makower & Bevan em 1963. Estes pesquisadores propuseram que determinadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos: micocinogênico, sensível e neutro. Quando células micocinogênicas e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis

morriam. O fenótipo neutro refere-se as leveduras que são resistentes ao fator micocinogênico, mas não matam as células sensíveis.

A atividade micocinogênica tem sido detectada em várias espécies distribuídas em vários gêneros de leveduras pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, além dos chamados fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like”): *Aureobasidium*, *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (Walker *et al.*, 1995). Certas micocinas têm sido também descritas como possuidoras de atividade antimicrobiana em algumas bactérias gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* (Izgu & Altinbay, 1997). Um importante parâmetro para a detecção da atividade micocinogênica é o pH do meio de cultivo e a temperatura de incubação escolhidos para os testes de triagem. Esta atividade é geralmente expressa em condições ácidas entre 22°C e 28°C (Criseo *et al.*, 1999; Zagorc *et al.*, 2001; Schmitt & Breinig, 2002).

Após os primeiros estudos na natureza do fator “killer”, foi demonstrado que os genes que codificam esta toxina podem estar presentes em cromossomos da levedura (como por exemplo *Pichia*), em plasmídeos de DNA (*Kluyveromyces*) ou em RNA associado com partículas virais (*Saccharomyces cerevisiae*) (Magliani *et al.*, 1997). Essa diversidade de localização dos determinantes genéticos reflete a distribuição do fenótipo “killer” em um grande número de espécies e gêneros.

Nos últimos anos, inúmeras aplicações potenciais para o fenômeno “killer” têm sido descobertas. A aplicação de leveduras micocinogênicas como agentes de biocontrole ou como linhagens iniciadoras de processos fermentativos tem crescido consideravelmente. Um dos objetivos principais é de eliminar cepas selvagens contaminantes, responsáveis pela deterioração de alimentos e pela produção de compostos indesejáveis no vinho, cerveja e no chope (Lowe *et al.*, 2000; Magliani *et al.*, 1997; Zagorc *et al.*, 2001). Leveduras micocinogênicas também tem sido utilizadas no controle biológico de agentes nocivos a cereais, legumes e frutas (Walker *et al.*, 1995; Fredlund *et al.*, 2002; Castoria *et al.*, 2001) e na biotipagem de leveduras e fungos semelhantes a leveduras patogênicos ao homem (Boekhout & Scorzetti, 1997; Buzzini & Martini, 2001). Outra aplicação biotecnológica das leveduras micocinogênicas é a inibição do crescimento de fungos patogênicos para o homem com o objetivo de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento de micoses humanas (Séguy *et al.*, 1998; Schmitt & Breinig, 2002). Algumas leveduras são reconhecidas como patógenos humanos oportunistas, sendo as mais importantes *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Porém, cada vez mais outras espécies estão sendo isoladas de pacientes em todo o mundo (Fricker-Hidalgo *et al.*, 2001). Estudos de competição entre leveduras têm demonstrado que as linhagens patogênicas podem ter o crescimento inibido pelo antagonismo de leveduras saprofitas (Magliani *et al.*, 1997). A ampliação do número de isolados com esta capacidade é de extremo interesse para o estudo do controle de infecções fúngicas.

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura de relevante interesse clínico por ser o patógeno causador da meningite criptocócica em pacientes com imunodeficiência e possui três variedades, de acordo com seus sorotipos: variedade *gatti* sorotipo B e C, variedade *neoformans* sorotipo D e variedade *grubii* sorotipo A (Franzot & Salkin, 1999). De acordo com dados do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 1998, 4,5% das infecções oportunistas associadas a pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA) foram causadas por *C. neoformans* (Levi, 1996). Candidíase orofaríngea têm sido reportada em 20 a 40% de todos os pacientes com SIDA, da mesma forma que candidíase vulvovaginal ocorre em aproximadamente 40% das mulheres infectadas. Uma das consequências da terapia antifúngica supressiva em pacientes com SIDA tem sido o emergente surgimento de espécies de *Candida* e variedades de *Cryptococcus neoformans* com resistência a essas drogas (Fichtenbaum et al, 2000; Mitchell & Perfect, 1995). Considerando a importância clínica destes patógenos, a procura por novas substâncias antimicrobianas para o tratamento destas doenças é uma necessidade crescente e testes de triagem *in vitro* com leveduras micocinogênicas são uma importante ferramenta.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento e purificação das culturas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras**

As folhas do *Hibiscus rosa-sinensis* foram coletadas no dia 12 de fevereiro de 2003 no Parque Farroupilha, localizado no centro da cidade de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. Dezenove folhas maduras pertencentes a duas plantas foram assepticamente coletadas em sacos plásticos estéreis, transportadas para o laboratório e processadas dentro de cinco horas. As folhas foram lavadas com água destilada estéril, de onde quinze folhas foram processadas através da técnica de “imprinting”, na qual coloca-se as folhas em contato direto com o meio de cultura em três diferentes tempos de contato (folhas nº 1 a 15): 0h (colocar a folha e retirá-la imediatamente), 1h e 24h. Utilizou-se como meio de cultura Agar YEPG (Extrato de levedura 0,5%, Glicose 2%, Peptona 1%, Agar 2%) acrescido de 0,04% de cloranfenicol [pH 4,0]. Após as folhas terem sido removidas, as placas foram incubadas a 25°C por 3 dias. Colônias de leveduras e fungos

semelhantes a leveduras (“yeast-like fungi”) de cada tipo morfológico foram selecionadas e purificadas pela técnica do esgotamento em placas de Petri contendo Agar YEPG para obter culturas puras. Foram escolhidas para isolamento colônias com características morfológicas distintas e que se apresentassem fisicamente distantes na placa.

O método de isolamento de leveduras balistosporogênicas também foi empregado. As quatro folhas remanescentes da amostragem (folhas nº 16 a 19) foram mantidas suspensas por meio de uma gaze estéril em uma placa de Petri contendo o mesmo meio de isolamento, mas sem contato direto com este (Valente, 2000). As placas foram incubadas a 25<sup>o</sup>C por 2 semanas, e as colônias formadas a partir dos balistosporos lançados contra o meio foram isoladas e purificadas de acordo com o método descrito acima.

### **3.2 Manutenção das culturas**

Todas as leveduras e fungos semelhantes a leveduras utilizados neste trabalho foram conservados em tubos de ensaio com meio GYMP (2% glicose, 2% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% fosfato de sódio monobásico e 2% Agar), com repiques sucessivos a cada 8 meses. Após crescimento das culturas a 22<sup>o</sup>C por 72 horas, eram cobertos com cerca de 2mL de óleo mineral estéril e mantidos em geladeira, numa temperatura média de 4<sup>o</sup>C.

### **3.3 Taxonomia convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like fungi”)**

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram fenotipicamente caracterizados por testes padrões morfológicos e fisiológicos (Yarrow, 1998). A identificação das leveduras foi realizada de acordo com Barnett *et al.* (2000) e o software YEASTCOMPARE (C. Ciriello e M.A. Lachance, Copyright © 1999-2001), que compara as características fisiológicas das leveduras com as de espécies conhecidas. A identificação dos fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like fungi”) seguiu métodos convencionais (de Hoog & Yurlova, 1994; de Hoog & Guarro, 1995; Middelhoven & de Hoog, 1997), na sua maioria baseados em fatores macro e micromorfológicos tais como diâmetro da colônia, cor e textura, dimensão e morfologia da hifa, e presença de estruturas reprodutivas. Em alguns casos, características fisiológicas também foram avaliadas, tais como crescimento em diferentes temperaturas e testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio específicas. Estes testes foram analisados de acordo com os métodos empregados para a identificação convencional de leveduras (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

#### **3.3.1 Observações macromorfológicas**

##### **3.3.1.1 Características morfológicas coloniais**

Foram observadas as características coloniais como cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta), brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), margem (regular, irregular, lobada ou com



raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura, seca), segundo Yarrow (1998).

### **3.3.1.2 Demonstração de balistosporos**

A produção de balistosporos é um critério importante para a distinção de espécies de leveduras com afinidade basidiomicética. Os balistosporos, quando amadurecidos, são ejetados para o meio ambiente violentamente. Uma característica indicativa de que os balistosporos estão sendo produzidos pelo isolado é a produção espontânea de colônias satélites (Kreger-van Rij, 1984; Neufeld, 1999). Um simples procedimento para a demonstração dessa característica foi aplicado. Inoculou-se a levedura suspeita na superfície de uma placa contendo Agar Fubá (1,7% fubá; 0,5% Agar). Fechou-se a base desta placa com a base de uma outra placa contendo Agar YEPG, selando ambas, assepticamente, com fita adesiva. Incubou-se a placa, com a base contendo o inóculo para cima, durante 7 dias a 25°C. As culturas produtoras de balistosporos desenvolveram um crescimento no Agar YEPG idêntico ao semeado no Agar Fubá (Barnett *et al.*, 2000).

### **3.3.2 Observações micromorfológicas**

#### **3.3.2.1 Características morfológicas da célula leveduriforme**

Foram realizadas lâminas a fresco a partir do crescimento de culturas em Agar YEPG com no máximo uma semana de incubação a 25°C e a observação foi feita em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000 vezes. Os caracteres morfológicos celulares observados foram: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, caso seja por brotamento, tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascosporos e de balistosporos, segundo Barnett *et al.* (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

#### **3.3.2.2 Verificação da formação de ascosporos**

A observação de ascosporos foi realizada utilizando um meio especial para induzir a sua produção: o meio Agar acetato (0,5% de acetato de sódio trihidratado + 2% de ágar), com incubação a 22°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascosporos. As características observadas em microscopia óptica foram a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação.

Devido à dificuldade de visualização dos ascosporos por montagens diretas com água de alguns isolados, dois procedimentos de coloração de ascosporos foram empregados. O primeiro, denominado método de Wirtz, cora

os esporos de verde azulados e as células vegetativas de vermelho. No esfregaço da cultura teste, cobriu-se a lâmina com uma solução aquosa de verde malaquita 5%, aquecendo-a até a emissão de vapores por 5 minutos. Lavou-se e, posteriormente foi realizada a contra-coloração com uma solução aquosa de safranina por 30 segundos. Após lavagem e secagem da lâmina, examinou-se os ascosporos em objetiva de imersão. O segundo procedimento de coloração de ascosporos é o método de Ziehl-Neelsen. Neste método, após confecção do esfregaço da cultura teste, cobriu-se a lâmina com fuccina de Ziehl concentrada, aquecendo-a durante 5 minutos a lâmina até a emissão de vapores. Após escorrer o excesso de corante da lâmina, adicionou-se etanol 95% com 1% de ácido clorídrico para promover a diferenciação das células vegetativas dos ascosporos, já que estes são álcool-ácido resistentes. Em seguida foi realizada a contra-coloração do fundo com azul de metileno 1% por 30 segundos, lavagem com água corrente e secagem para observar sob imersão os ascosporos avermelhados, sobre um fundo azul disposto de células vegetativas (Neufeld, 1999).

### **3.3.2.3 Técnica de microcultivo em lâmina**

O cultivo em lâmina (microcultivo) foi a técnica escolhida para observação de pseudomicélio ou de micélio verdadeiro, utilizando o meio de cultura Agar Fubá. Dentro de uma placa de Petri colocou-se um chumaço de algodão, dois palitos quebrados em forma de U, uma lâmina de microscopia (sobre os palitos) e uma lamínula. Após autoclavação do material, colocou-se assepticamente pequenos blocos de 1-2 cm<sup>2</sup> de meio de cultura sobre a lâmina

de microscopia dentro da placa de Petri. Em seguida inoculou-se o bloco de agar com os isolados de fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like”) por arrastamento da alça em suas bordas e partes laterais, e colocou-se a lamínula sobre o bloco de Agar. Depois de semeado o agar, adicionou-se água destilada estéril sobre o algodão e incubou-se a placa por 5 dias a 30°C (Barnett *et al.*, 2000), onde realizou-se a observação em microscópio óptico nos aumentos 200x e 400x.

### **3.3.3 Testes bioquímicos**

#### **3.3.3.1 Testes de fermentação**

A fermentação alcoólica pode ser considerada como a oxidação anaeróbica de um carboidrato com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos secundários. Se um carboidrato for fermentado, ele será assimilado, porém o contrário não é necessariamente uma verdade. Se a fermentação ocorre, a glicose será sempre fermentada (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000)

Verificou-se, portanto, a capacidade de cada levedura e fungo semelhante a levedura de fermentar a glicose, a galactose e a maltose. Antes da realização de cada teste, as culturas foram repicadas em Agar YEPG para obtenção de células ativas metabolicamente e incubadas por 48 horas a temperatura ambiente ( $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Estas culturas foram, posteriormente, inoculadas em tubos de ensaios com meio para fermentação contendo tubos de Durham invertidos no seu interior. Os tubos de fermentação foram lidos

regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a inoculação. A produção de gás foi confirmada pelo seu acúmulo nos tubos de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando apenas foram observadas algumas bolhas de gás no tubo de Durham, +1 quando apenas 1/3 do tubo de Durham estava ocupado por gás, +2 quando o gás estiver presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham encontrou-se cheio de gás. As cepas cujas leituras registraram-se +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras. As que tiveram leitura +1 foram consideradas fermentadoras fracas. As culturas que tiveram resultado positivo para fermentação de glicose foram testadas para fermentação de galactose e de maltose (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

### **3.3.3.2 Teste de assimilação de fontes de carbono**

Esse teste baseou-se na capacidade de assimilação das leveduras nas respectivas fontes de carbono: glicose, galactose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, amido solúvel, xilose, L-arabinose, ramnose, etanol, glicerol, isopropanol, manitol, glucitol, salicina, citrato, inositol e N-acetilglicosamina. A habilidade ou não de assimilar diferentes açúcares permite a separação das espécies de acordo com o seu padrão de assimilação. Tradicionalmente, três principais métodos são utilizados: o método de Wickerham em tubos com meios líquidos, auxanograma em placas com Agar base nitrogenado e o inóculo e, por fim, o método de réplica em placas (Barnett *et al.*, 2000). Neste nosso experimento, o procedimento escolhido foi o método

de Wickerham. Este método estima a densidade celular através da turvação da solução: um número de células/mL entre  $10^5$  e  $10^6$  equivale ao grau 1 de Wickerham; um número de células/mL entre  $10^7$  e  $10^8$  equivale ao grau 2 de Wickerham e, por fim, um número de células/mL acima de  $10^8$  é representado pelo grau 3 de Wickerham (Pfaller *et al.*, 1988).

As cepas foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Agar YEPG, em tubos contendo 2 mL de água destilada estéril, por dois dias, para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de Wickerham no grau 0,5. Após esse período, uma alíquota de 30 $\mu$ L de cada levedura foi inoculada em tubos contendo as fontes de carbono descritas acima e incubados por 21 dias a 22°C. A concentração celular foi avaliada a cada 7 dias através do cartão de Wickerham (Pfaller *et al.*, 1988). A proporção química de cada meio foi de 0,67% de YNB (Yeast Nitrogen Base, DIFCO) e 0,5% da respectiva fonte de carbono, com exceção da rafinose, que foi 1% (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000). Como controle positivo foi usado um tubo com meio YNB com glicose, e como controle negativo um tubo apenas com YNB (0,67%).

### **3.3.3.3 Teste de assimilação de fontes de nitrogênio**

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras possuem a capacidade de utilizar sulfato de amônia, asparagina, peptona e uréia aerobicamente como única fonte de nitrogênio. Porém, determinados compostos nitrogenados como nitrato de potássio, nitrito de sódio, lisina, creatina, creatinina, aminas alifáticas e alguns aminoácidos são seletivamente utilizados por diferentes leveduras

(Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000). Assim, o propósito de testar se uma levedura possui a habilidade de utilizar determinadas fontes de nitrogênio é uma característica importante na sua identificação.

O teste de assimilação de fontes de nitrogênio baseou-se na utilização de nitrato, nitrito, lisina, creatina e creatinina como única fonte desse elemento, utilizando a técnica de auxanograma. As cepas foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Agar YEPG, em tubos contendo 3mL de água destilada estéril, por dois dias, para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de Wickerham (grau 0,5). Ao mesmo tempo, foi preparado meio contendo YCB 1,17% com 2% de agar em uma quantidade proporcional a 15mL para cada placa que for inoculada a levedura, porém sendo hidratado em apenas 12mL. Após essa fase, foram misturados os 3mL do inóculo leveduriforme em água estéril com os 12mL do meio preparado, previamente resfriado a aproximadamente 45°C, e vertidos em uma placa estéril. Após a solidificação do meio, pitadas das respectivas fontes de nitrogênio foram adicionadas de forma equidistante no perímetro da placa, tendo o centro desta servido como controle negativo e a peptona como controle positivo (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

### 3.3.4 Testes fisiológicos

#### 3.3.4.1 Teste com Agar uréia de Christensen

No teste de produção de urease em meio uréia de Christensen, as linhagens foram inoculadas a partir de culturas recentes em ágar YEPG em tubos contendo 3 mL do meio sólido Agar Ureia (Peptona 1%, Glicose 1%, NaCl 5%, Fosfato monopotássico 2%, Vermelho de fenol 0,012% e Uréia 3%). Inicialmente autoclavou-se todos os constituintes nos tubos com 2,5 mL cada, com exceção da uréia que foi esterilizada por filtros de celulose de 0.22  $\mu\text{m}$ . Após autoclavação, adicionou-se 0.5 mL de uréia filtrada (20%), homogeneizou-se e inclinou-se os tubos, deixando solidificar. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados a temperatura ambiente por 3 dias, sendo as leituras realizadas diariamente. A atividade da enzima urease, quando presente na cepa, provocou uma viragem do indicador vermelho de fenol de uma cor amarelada para rosada (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

Uma alternativa a esta técnica foi a utilização de placas de Petri em vez de tubos de ensaio. Ao contrário dos tubos de ensaio que eram autoclavados junto com os constituintes termorresistentes da formulação, as placas de Petri eram previamente esterilizadas sob calor seco no forno de Pasteur a 180°C durante 2 horas. Após autoclavada parte dos constituintes e filtrada a uréia, verteu-se simultaneamente 12mL do Agar base e 3 mL da uréia nas placas de Petri. Homogeneizou-se lentamente sob movimentos circulares e esperou solidificar-se para inocular as linhagens a serem testadas. A incubação e a leitura dos resultados foram realizadas conforme descrito no item anterior.



#### **3.3.4.2 Teste de crescimento em diferentes temperaturas**

Devido às leveduras crescerem numa ampla faixa de variação térmica (de 0 a 47°C), o teste de temperatura de crescimento pode contribuir para a identificação de algumas leveduras. Portanto, este teste avalia a capacidade de crescimento das leveduras e fungos semelhantes a leveduras nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 37°C e 42°C, sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria das espécies de 20°C a 30°C. As espécies patogênicas crescem otimamente entre 30°C e 37°C, sendo o crescimento a 37°C bem característico. O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado com a utilização do meio caldo YEPG. Após a inoculação, os tubos foram incubados em banho-maria nas respectivas temperaturas testadas por até quatro dias, sendo a leitura realizada diariamente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Kreger-van Rij, 1984; Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

#### **3.3.4.3 Teste de tolerância ao caldo YEPG com NaCl 10% e 16%**

As espécies de leveduras diferem na capacidade de suportarem soluções hipertônicas, tornando essa característica mais uma ferramenta no conjunto de provas fenotípicas para a identificação desses microrganismos. Avaliou-se, portanto, a capacidade de crescimento das leveduras, durante uma semana, em duas concentrações de soluções salinas hipertônicas; NaCl 10% e 16%. O meio utilizado foi o caldo YEPG modificado (acrescido de NaCl). Para controle positivo utilizou-se o meio sem NaCl. Após a inoculação, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por até quatro dias, sendo a leitura

realizada diariamente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Barnett *et al.*, 2000).

#### **3.3.4.4 Teste de tolerância à glicose 50%**

Seguindo os mesmos preceitos do teste de tolerância a soluções hipertônicas, foi testada a capacidade da levedura em multiplicar-se em meio com alta porcentagem de glicose (solução glicosilada hipertônica), composto de 0,67% de YNB, 2% de Agar e 50% glicose. Após a inoculação, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por até quatro dias, sendo a leitura realizada diariamente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Barnett *et al.*, 2000).

#### **3.3.4.5 Teste de produção extracelular de compostos amilóides**

Este teste ajuda a identificar determinadas espécies, especialmente aquelas do gênero *Cystofilobasidium* e *Leucosporidium*, bem como a maioria das espécies de *Cryptococcus*, que possuem por característica formar compostos polissacarídeos amilóides (Barnett *et al.*, 2000). Para avaliar esta característica, adicionou-se uma solução de lugol (solução de iodo com iodeto de potássio 1:5) a um tubo com crescimento positivo da amostra em meio base nitrogenado (YNB) com glicose. O resultado positivo foi evidenciado pela formação de um complexo azulado, devido a reação do composto amilóide com a solução de iodo.

### **3.4 Avaliação do potencial biotecnológico**

#### **3.4.1 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático extracelular**

Todas as linhagens testadas foram previamente crescidas em Agar YEPG por 24h para verificação da pureza das culturas e obtenção de células metabolicamente ativas. Placas e tubos com os substratos enzimáticos correspondentes foram avaliados semi-quantitativamente para a presença ou ausência de atividade enzimática e seus resultados classificados como negativo (-), fraco (W), positivo (+) ou forte atividade (++), de acordo com o halo de atividade enzimática em meio sólido, ou pelo grau de turbidez (cartão de wickerham) no meio líquido. Um crescimento celular em meio líquido equivalente ao grau 1 de Wickerham foi considerado como atividade fraca; um número de células/mL equivalente ao grau 2 de Wickerham representou uma atividade positiva; enfim, um número de células/mL acima de  $10^8$  (grau 3 de Wickerham) caracterizou-se como forte atividade. Já em meio sólido, as escalas em centímetros dos diâmetros de difusão da enzima foram classificadas como: fraca atividade, quando menor ou igual a 1,5cm, atividade positiva entre 1,5cm a 3cm, e forte atividade acima de 3cm. Os resultados positivos foram repetidos para confirmação dos dados e nenhum resultado discrepante foi encontrado.

##### **3.4.1.1 Produção de lipase**

A atividade lipolítica foi testada em tubos de ensaio contendo o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) acrescido de 0,5% Tween 20 como fonte de

carbono (Von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989; Plou *et al.*, 1998). As linhagens, previamente inoculadas em água destilada durante 24 horas para exaurir suas reservas endógenas, foram incubadas a 25<sup>0</sup>C por 7 dias e sua atividade enzimática foi mensurada através do cartão de Wickerham. A turvação do meio de cultura devido ao crescimento celular foi considerada como resultado positivo.

#### **3.4.1.2 Produção de esterase**

A capacidade de hidrolisar ésteres foi testada em placas de Petri contendo Peptona 1%, NaCl 0,5%, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1%, Tween 80 1% e Agar 2%, pH 7 (Slifkin, 2000; Buzzini e Martini, 2002). A presença da atividade enzimática foi evidenciada por um halo opaco visível ao redor da colônia.

#### **3.4.1.3 Produção de celulase**

A produção de celulase foi determinada de acordo com Strauss *et al.* (2001) e Buzzini e Martini (2002), com algumas modificações. O teste foi realizado em placas de Petri contendo Agar YP-glicerol-CMC (Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Glicerol 3%, Agar 2% e Carboximetilcelulose 0,4%). As placas foram incubadas por 5 dias a 30<sup>0</sup>C. Após esse período, verteu-se sobre as placas uma solução contendo o corante Vermelho Congo 0,03%. Após 30 minutos, retirou-se o excesso do corante e adicionou-se solução de NaCl 1M durante 15 minutos. A atividade celulolítica das linhagens foi verificada pela formação de uma pálida zona avermelhada em volta da colônia

produtora presente no meio de cultura. A cor predominante do restante do meio é vermelho intenso.

#### **3.4.1.4 Produção de caseinase**

A hidrólise da caseína foi testada em placas de Petri contendo o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67% acrescido de 0,5% glicose, 0,5% caseína e 2% Agar, ajustado para pH 7,0 com KOH 5N (Hagler & Ahern, 1981; Braga *et al.*, 1998; Strauss *et al.*, 2001; Trindade *et al.*, 2002). A revelação realizou-se após sete dias de incubação a 25°C, com a adição de HCl 1N na superfície do meio deixando reagir com a caseína por 1 hora. O resultado positivo foi considerado quando ao redor do inóculo surgiu um halo transparente devido à hidrólise da caseína, circundado por um fundo com coloração esbranquiçada correspondendo à área onde a caseína não tinha sido hidrolisada, sendo, portanto, desnaturada por ação do ácido clorídrico.

#### **3.4.1.5 Produção de gelatinase**

A hidrólise de gelatina foi avaliada utilizando o meio malte-gelatina (Extrato de malte 10% e Gelatina 12%) tamponado em pH 4,2 utilizando tampão citrato 0,05M, em tubos de ensaio (Yarrow, 1998; Abranches *et al.*, 1997; Trindade *et al.*, 2002). As leveduras, após crescidas em ágar YEPG por 48h a 25°C, foram inoculadas na superfície do meio (em tubos) e incubadas durante 21 dias a 25°C. Após esse período, deixou-se os tubos durante 2 horas a 4°C e avaliou-se a atividade enzimática de acordo com o grau de hidrólise do meio. Considerou-se produtoras de gelatinase aquelas linhagens que

liquefizeram parcial ou até completamente o meio de cultura após a retirada dos tubos da geladeira.

#### **3.4.1.6 Produção de amilase**

A capacidade de degradar o amido solúvel foi realizada da seguinte forma: primeiro cresceu-se a cultura em Agar amido contendo Yeast Nitrogen Base 0,67% (YNB, Difco), Amido solúvel 0,2% e Agar 2%, com pH 6 (Buzzini & Martini, 2002; Strauss *et al.*, 2001). Após 7 dias de incubação adicionou-se uma solução de iodeto de potássio (Iugol) à placa de agar amido, observando-se, após um período de 30 minutos, um nítido halo amarelado ao redor do crescimento das cepas consideradas positivas. O restante do meio torna-se corado de violeta. A reação se deve pela captura do iodo pelas duas moléculas polissacarídeas (amilose e amilopectina) constituintes da estrutura básica do amido, formando um composto escuro (MacFaddin, 2000).

Para excluir a hipótese de que a concentração do agar em 2% num meio contendo amido (homopolissacarídeo formado por  $n$  moléculas de  $\alpha$ -D-glicose) poderia resultar em falsos negativos devido a uma maior dificuldade de difusão da enzima, para as linhagens que apresentaram fraca atividade, foram testadas duas variações da composição do meio: com a concentração do Agar em 1,5% e 1%, já considerados em estado semi-sólido.

#### **3.4.1.7 Produção de celobiase e $\beta$ -galactosidase (lactase)**

A capacidade de degradar celobiose e lactose foi verificada em conjunto com os testes bioquímicos para a identificação de leveduras (Barnett *et al.*,

2000; Yarrow, 1998). As linhagens foram previamente inoculadas em água destilada por 24 horas para exaurir suas reservas energéticas endógenas, conforme descrito no item 3.3.1.3.2. Crescimento celular nos tubos dentro de um período de 7 dias a 22°C indica a atividade enzimática sobre a celobiose ou a lactose. A intensidade deste crescimento foi mensurada pelo grau de turvação em meio líquido devido ao crescimento celular, através do cartão de Wickerham.

#### **3.4.1.8 Produção de xilanase**

As linhagens foram testadas quanto a sua capacidade produtora de hemicelulase (xilanase) de acordo a metodologia descrita por Strauss *et al.* (2001), com algumas modificações. Os isolados foram testados em placas de Petri contendo YP-glicerol-Xilana agar (Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Glicerol 3%, Agar 2% e Remazol Brilliant Blue Xylan 0,2% [RBB-Xylan Sigma]). Após a incubação por um período de 5 dias a 30°C, a atividade xilanase foi identificada por uma zona clara ao redor da colônia.

#### **3.4.2 Produção de substâncias antimicrobianas**

##### **3.4.2.1 Culturas patogênicas**

As cepas de leveduras patogênicas empregadas nos ensaios de avaliação da atividade micocinogênica foram *Candida albicans* ATCC1880, UFRGS 0050-L e UFRGS 0051-L; *C. dubliniensis* NRRL 17841; *C. glabrata* ATCC 2001e IMUFRJ 50083; *C. guilliermondii* NRRL 2075; *C. krusei* CBS 573;

*C. parapsilosis* NRRL Y-22019, UFRGS 0052-L, UFRGS 0053-L e UFRGS 0054-L; *C. tropicalis* NRRL 12968, UFRGS 0055-L e UFRGS 0056-L, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 32045A, Cbiot Az19; *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28958D, Cbiot A45; *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957D; *C. neoformans* var. *gatti* ATCC 24065B, ATCC 24066, Cbiot AL5, Cbiot HSL3, Cbiot Az26, Cbiot AL13 e Cbot Az32; *Cryptococcus neoformans* híbrido AD ATCC 48184. Os patógenos foram mantidos em tubo com Agar GYMP inclinado a 4°C, cobertos por óleo mineral estéril.

#### **3.4.2.2 Teste para detectar linhagens com fenótipo “killer” (produtoras de micocinas)**

A atividade micocinogênica foi testada de acordo com o protocolo descrito por Starmer *et al.* (1987) e Abranches *et al.* (1997), em triplicata em placas de Petri contendo meio Agar YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1,0% glicose, 2% Agar) com 0,003% azul de metileno e tamponado a pH 4,2 com tampão citrato 0,05M. Cada cepa sensível foi crescida por 24 horas a 22<sup>0</sup>C em meio Agar YM e diluída em água destilada estéril até uma concentração de aproximadamente 10<sup>5</sup> células/mL (grau 0,5 da escala de Wickerham), sendo posteriormente espalhada na superfície do meio com suabe estéril. As leveduras testadas quanto a capacidade micocinogênica foram também crescidas em meio Agar YM por 24 horas a 22<sup>0</sup>C e inoculadas, na forma de um disco de 1cm de diâmetro, na superfície do meio contendo a cepa sensível previamente espalhada. Incubou-se as placas à temperatura de



22<sup>0</sup>C durante 72 horas, havendo leituras diárias das mesmas. As cepas foram consideradas micocinogênicas quando o crescimento das linhagens inoculadas esteve envolto por uma zona de inibição, onde não ocorre o crescimento da cepa sensível, e uma zona azul adjacente à zona de inibição, indicando morte celular. O indicador da atividade micocinogênica é a zona azul de células mortas envolvendo a zona de inibição.

#### **3.4.2.3 Avaliação da atividade “killer” de linhagens selecionadas em diferentes meios de cultura**

A atividade micocinogênica de linhagens selecionadas foi avaliada conforme descrito no item anterior, utilizando o meio Agar YM em três diferentes pHs (3.0, 4.0 e 5.0) com adição de azul de metileno 0.003% (YM-MB) e no meio agar YEPG, como descrito por Walker *et al.* (1995). A atividade micocinogênica foi avaliada contra as leveduras patogênicas ao homem dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. As cepas foram consideradas como possuidoras de atividade micocinogênica ou “killer” quando houve uma zona de inibição (com uma zona azul adjacente à zona de inibição, indicando morte celular) do crescimento dos fungos patogênicos maior que 3mm (distância média do espaço entre a margem da colônia “killer” e o início do crescimento da cepa sensível) ao redor da colônia das leveduras testadas. Uma zona de inibição nítida, mas menor do que 3mm foi interpretada como fraca atividade micocinogênica ou “killer”.

#### **3.4.2.4 Confirmação da atividade micocinogênica**

A atividade micocinogênica foi confirmada por testes contra 9 isolados de diversas espécies patogênicas de *Candida* e 14 isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* (variedades *gatti*, *grubii* e *neoformans*).

#### **3.4.2.5 Teste de cura do fenótipo “killer”**

O teste de cura avalia a capacidade de perda da característica micocinogênica após sucessivas exposições a situações de estresse para a célula produtora, como choque térmico, radiação ultravioleta e utilização de compostos danosos ao DNA (brometo de etídio, 5-fluoracil ou metanosulfonato de etila), indicando o grau de estabilidade da toxina produzida para aplicações biotecnológicas (Magliani *et al.*, 1997). Neste experimento foram utilizadas elevadas temperaturas de incubação como mecanismo estressante para a célula. Sucessivos repiques das linhagens micocinogênicas foram incubadas na sua temperatura máxima de crescimento (40°C) durante um mês, para após esse período ser avaliado se houve alteração da sua capacidade de produção da toxina.

### **3.5 Listagem dos equipamentos**

Os equipamentos utilizados nos experimentos estão listados na tabela 1.

#### **3.4.2 Listagem de meios de cultura utilizados**

Os meios de cultura utilizados estão listados na tabela 2.

**TABELA 1:** Listagem dos equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Câmara de fluxo laminar	VECO	VLFS-12
Autoclave vertical	PHOENIX	AV30
Geladeira	CONSUL	PRATICE 230
Freezer vertical	ELETROLUX	F210
Estufas incubadoras	BIOPAR	TI06
Destilador de água	BIOPAR	PILSEN
Banho-maria	NOVA TÉCNICA	GEFRAN 500
Microscópio	OLYMPUS	CX40
Balança analítica	MARTE	AL200C
Estufa de secagem	BIOMATIC	Sem identificação
Forno de Pasteur	BIOMATIC	Sem identificação
Filtro de esterilização	SCHLEICHER	0.02 $\mu$ m
Centrífuga	SANYO	MICRO CENTAUR

**TABELA 2:** Listagem dos meios de culturas utilizados.

Agar Batata Dextrose	3,9% PDA; 0,5% Agar; 0,04% de cloranfenicol; ajustar para pH 4,0
Agar YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% Agar
Caldo YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura
Agar GYMP	2% glicose; 2% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de fosfato de sódio monobásico; 2% Agar
Meio YM-MB	0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% Agar; 0,003% azul de metileno
Corn Meal Agar (Agar Fubá)	1,7% Corn Meal Agar; 0,5% Agar; 0,04% cloranfenicol; ajustar pH para 4,0
Meio para fermentação de açúcares	0,75% peptona; 0,45% de extrato de levedura; 2% (glicose / lactose / galactose / maltose)
Meio para a assimilação de fontes de carbono	0,67% base nitrogenada para leveduras (YNB); 2% Agar Difco; 0,5% fonte de carbono (1% rafinose)
Meio para a assimilação de fontes de nitrogênio	1,17% de Yeast Carbon Base (YCB); 0,078% Nitrato de potásio
Meio para a observação de ascósporos	0,5% acetato de sódio trihidratado; 2% Agar
Meio para a observação de balistosporos	1,7% Corn Meal Agar; 2% Agar Água
Teste Urease	1,17% YCB ; 2% Agar ; 1% Uréia; Fuccina ácida
Teste com Agar uréia de Christensen	1% de Peptona; 1% de Glicose; 5% de NaCl; 2% de Fosfato monopotássico; 0,012% de Vermelho de fenol; 20% de Uréia
Teste de resistência a NaCl 10 e 15%	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% Agar; 10 ou 15% de NaCl
Teste de resistência a 50% de glicose	0,67% de YNB; 50% glicose

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento e purificação das culturas leveduriformes**

O isolamento das leveduras pela técnica de “imprinting” foi somente possível em cinco folhas (folhas 1 à 5) que tiveram o contato com o meio no tempo 0h (toque e retirada imediata da folha no meio de cultura), devido ao demasiado crescimento de fungos filamentosos nos outros tempos de tratamento. Nas quatro remanescentes folhas que foram submetidas ao teste de balistosporos, em somente duas (folhas 16 e 17) houve isolamento de cepas leveduriformes. Portanto, a partir de 7 folhas, um total de 84 colônias de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like fungi”) de diferentes tipos morfológicos, que se apresentaram macroscopicamente distantes na placa, foram selecionadas e purificadas pela técnica do esgotamento em placas de Petri contendo Agar YEPG.

#### **4.2 Identificação fenotípica de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis***

Das 84 colônias, 61 representam leveduras verdadeiras e 23 fungos semelhantes a leveduras. As 61 linhagens de leveduras isoladas pertencem a 40 espécies, sendo 31 de afinidade ascomicética e 30 de afinidade basidiomicética. A listagem com a identificação presuntiva das linhagens de leveduras e fungos semelhantes a leveduras, assim como a folha de onde foram isolados, podem ser vistas na tabela 3. Os fungos semelhantes a leveduras foram classificados, segundo suas características macro e micromorfológicas em dez grupos diferentes. A maioria destes fungos é pertencente às leveduras pretas ou “black-yeasts”.

Os isolados identificados com o nome da espécie seguido pelo sufixo “-similar” ou “-like” significam que são muito semelhantes a uma determinada espécie, entretanto diferem da descrição da cepa tipo desta espécie. Algumas linhagens foram identificadas apenas em nível de gênero seguido pelo sufixo “sp.”, significando que a identificação pelos métodos convencionais não foi possível. Esses isolados podem representar possíveis biótipos ou espécies novas.

**TABELA 3:** Listagem com a identificação presuntiva das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis* e número da folha de onde foram isoladas.

Ascomicetos	cepa	Folha Nº-	Basidiomicetos	cepa	Folha Nº-	Fungos semelhantes a leveduras ("Yeast-like")	cepa	Folha Nº-
<i>Candida</i> spp.	HB13	1	<i>Bullera</i> sp.	HB91	16	<i>Aureobasidium</i> sp.	HB07	1
	HB22	1	<i>Bullera pseudoalba</i>	HB67	4		HB08	1
	HB43	3	<i>Bullera-variabilis-like</i>	HB24B	1		HB11B	1
	HB53	4	<i>Bullera alba</i>	HB78C	5		HB14	1
	HB60A	4	<i>Cryptococcus</i> sp <sub>1</sub>	HB80	5		HB41	3
	HB69	4	<i>Cryptococcus</i> sp <sub>2</sub>	HB87	3		HB44	3
	HB71	5	<i>Cryptococcus humicola-like</i>	HB34	2		HB26A	1
<i>Candida colliculosa-like</i>	HB79	5		HB76A	5		HB47	3
	HB57	4	<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB18	1		HB78A	5
	HB48	3		HB11A	1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HB64	4
<i>Candida famata</i> var. <i>flareri</i>	HB74	5	<i>Cryptococcus laurentii-like</i>	HB12A	1	<i>Aureobasidium pullulan-like</i>	HB30	1
<i>Candida glabrata</i>	HB73	5	<i>Filobasidium floriforme-like</i>	HB26B	1		HB21A	1
<i>Candida glabrata-like</i>	HB61	4	<i>Pseudozyma</i> sp.	HB27A	1	<i>Levedura preta</i>	HB28	1
<i>Candida insectorum</i>	HB97B	17		HB27B	1	<i>Levedura preta fermentadora</i>	HB49	4
<i>Candida robusta</i>	HB17A	1		HB97A	17		HB51	4
	HB17B	1	<i>Rhodotorula</i> sp.	HB29	1		HB45	3

**TABELA 3:** Continuação - Listagem com a identificação presuntiva das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis* e número da folha de onde foram isoladas.

	HB54B	4	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	HB21B	1	<i>Hormonema</i> sp.	HB23	1
	HB60B	4	<i>Rhodotorula minuta</i>	HB93V	16		HB76C	5
<i>Candida robusta-like</i>	HB25	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	HB90	16	<i>Hormonema schizolunatum-like</i>	HB16	1
<i>Candida santjacobiensis-like</i>	HB10	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB95	17	<i>Itersonilia perplexans</i>	HB85A	5
<i>Candida tenuis</i>	HB15	1	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>				HB54A	4
<i>Debaryomyces occidentalis – like</i>	HB83	5	<i>Sporobolomyces sasicola-like</i>	HB24A	1	<i>Itersonilia perplexans-like</i>	HB85B	5
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	HB68A	4	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	HB63	4	<i>Tilletiopsis</i> sp.	HB58	4
	HB68B	4	<i>Sporobolomyces roseus</i>	HB94	17			
<i>Debaryomyces polymorphus-like</i>	HB70	5	<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	HB96	17			
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB55	4	<i>Tremella brasiliensis-like</i>	HB89	16			
	HB88	5	<i>Tremella folliacea</i>	HB12B	1			
<i>Pichia scolyti-like</i>	HB66	4	<i>Trichosporon pullulans</i>	HB37	3			
	HB62A	4	<i>Trichosporon pullulans-like</i>	HB31	2			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HB19	1		HB85C	5			
<i>Saccharomyces cerevisiae/bayanus</i>	HB20	1						



#### **4.2.1 Testes morfológicos**

A avaliação macro e micromorfológica das linhagens de leveduras pode ser visualizada na tabela 4. As cepas de fungos semelhantes a leveduras também tiveram suas características macro e micromorfológicas avaliadas. Os isolados do gênero *Aureobasidium* apresentaram colônias mucóides, com pigmentação negra, formação de pequenos conídios hialinos sincrônicos localizados nos segmentos das hifas e esparsos endoconídios. Os isolados do gênero *Hormonema*, que também possuem hifas demáceas, diferenciaram-se dos isolados do gênero *Aureobasidium* por não apresentarem sincronismo dos conídios, nem endoconídios. As linhagens dos gêneros *Itersonilia* e *Tilletiopsis* não apresentaram colônias pretas, mas de coloração creme e textura rugosa. Não foi possível distinguir as características micromorfológicas das remanescentes linhagens identificadas como leveduras pretas, sendo estas portanto agrupadas segundo critérios macromorfológicos, como pigmentação da colônia.

#### **4.2.2 Testes bioquímicos e fisiológicos**

Os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos necessários podem ser vistos nas tabelas 5 e 6.

**TABELA 4:** Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

Linhasgens	Nº.	Coloração da colônia	Brilho da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Forma da célula	Tamanho da célula	Esporos sexuados	Formação de micélio
<b>Ascomicetos</b>									
<i>Candida</i> spp.	HB13	creme	opaca	lisa	cremosa	circular	pequena	ausente	ausente
	HB22	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
	HB43	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
	HB53	creme	opaca	lisa	cremosa	alongada	pequena	ausente	ausente
	HB60A	creme	opaca	lisa	mucóide	circular	média	ausente	ausente
	HB69	creme	opaca	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
	HB71	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Candida colliculosa-like</i>	HB79	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
	HB57	branca	brilhosa	lisa	mucóide	circular	pequena	ausente	ausente

**TABELA 4:** Continuação - Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB48	branca	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
<i>Candida famata var. flarerii</i>	HB74	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Candida glabrata-like</i>	HB61	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
<i>Candida glabrata</i>	HB73	creme	opaca	lisa	cremosa	circular	média	ausente	ausente
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB55	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ascosporos	pseudohifas
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB88	creme	brilhosa	rugosa	mucóide	oval	grande	ascosporos	pseudohifas
<i>Candida insectorum</i>	HB97B	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Candida robusta</i>	HB17A	branca	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
	HB17B	branca	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
	HB54B	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
	HB60B	branca	brilhosa	lisa	mucóide	circular	grande	ausente	ausente
<i>Candida robusta-like</i>	HB25	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Candida santjacobiensis-like</i>	HB10	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente
<i>Candida tenuis</i>	HB15	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	pequena	ausente	ausente
<i>Debaryomyces occidentalis - like</i>	HB83	creme	opaca	rugosa	mucóide	circular	média	ascosporos	pseudohifas
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	HB68A	branca	opaca	lisa	cremosa	circular	média	ascosporos	ausente
	HB68B	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	pequena	ascosporos	ausente

**TABELA 4:** Continuação - Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Debaryomyces polymorphus-like</i>	HB70	branca	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ascosporos	ausente
<i>Pichia scolyti-like</i>	HB66	creme	opaca	lisa	mucóide	oval	média	ascosporos	ausente
	HB62A	creme	brilhosa	lisa	mucóide	circular	média	ascosporos	ausente
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HB19	branca	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ascosporos	ausente
<i>Saccharomyces cerevisiae/bayanus</i>	HB20	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ascosporos	ausente
<b>Basidiomicetos</b>									
<i>Bullera</i> sp.	HB91	creme	opaca	lisa	mucóide	circular	média	balistosporos	pseudohifas
<i>Bullera pseudoalba</i>	HB67	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	média	balistosporos	ausente
<i>Bullera-variabilis-like</i>	HB24B	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	balistosporos	pseudohifas
<i>Bullera Alba</i>	HB78C	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	balistosporos	ausente
<i>Cryptococcus</i> spp.	HB80	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
	HB87	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
<i>Cryptococcus humicola-like</i>	HB34	creme	brilhosa	lisa	mucóide	circular	grande	ausente	ausente
	HB76A	creme	brilhosa	lisa	mucóide	alongada	média	ausente	ausente
<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB18	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	média	ausente	ausente

**TABELA 4:** Continuação - Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB11A	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	ausente	ausente
<i>Cryptococcus laurentii-like</i>	HB12A	creme	opaca	lisa	cremosa	alongada	grande	ausente	ausente
<i>Filobasidium floriforme-like</i>	HB26B	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente
<i>Pseudozyma sp.</i>	HB27A	creme	opaca	rugosa	esfarelada	canoa	média	ausente	raras hifas
	HB27B	creme	opaca	rugosa	esfarelada	canoa	média	ausente	raras hifas
	HB97A	creme	opaca	rugosa	esfarelada	canoa	média	ausente	raras hifas
<i>Rhodotorula sp.</i>	HB29	rosa claro	opaca	rugosa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	HB21B	creme	brilhosa	lisa	mucóide	circular	pequena	ausente	ausente
<i>Rhodotorula minuta</i>	HB93V	vermelha	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	HB90	rosa claro	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB95	vermelha	opaca	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Sporobolomyces sasicola-like</i>	HB24A	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	média	balistosporos	ausente
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	HB63	vermelha	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	balistosporos	ausente
<i>Sporobolomyces salmonicolor-like</i>	HB75	creme	opaca	lisa	mucóide	Oval / alongada	grande	balistosporos	pseudohifas
<i>Sporobolomyces roseus</i>	HB94	vermelha	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	balistosporos	ausente
<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	HB96	vermelha	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	balistosporos	ausente

**TABELA 4:** Continuação - Características morfológicas das culturas de leveduras isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Tremella brasiliensis-like</i>	HB89	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
<i>Tremella folliacea</i>	HB12B	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Trichosporon pullulans</i>	HB37	creme	opaca	lisa	mucóide	alongada	grande	ausente	artroconídeos
<i>Trichosporon pullulans-like</i>	HB31	creme	opaca	lisa	cremosa	alongada	grande	ausente	artroconídeos
	HB85C	creme	brilhosa	lisa	mucóide	alongada	grande	ausente	artroconídeos



**TABELA 5:** Continuação - Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Candida famata</i> var. <i>flareri</i>	HB74	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Candida glabrata-like</i>	HB61	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	HB73	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB55	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB88	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	W	+	-	+
<i>Candida insectorum</i>	HB97B	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Candida robusta</i>	HB17A	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB17B	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	w	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	HB54B	+	-	-	+	+	-	W	-	+	+	+	-	w	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	HB60B	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	W	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida robusta-like</i>	HB25	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	w
<i>Candida santjacobiensis-like</i>	HB10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Candida tenuis</i>	HB15	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	w	+	-	+	-	-	+	-
<i>Debaryomyces occidentalis - like</i>	HB83	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	w	+	-	-	+	-	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	HB68A	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	HB68B	+	+	w	+	+	+	+	-	+	w	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>Debaryomyces polymorphus-like</i>	HB70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	w	-	-
<i>Pichia scolyti-like</i>	HB66	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	w	+	-	+	+	-	+	-	+



**TABELA 5:** Continuação - Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB62A	+	+	-	+	+	+	w	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HB19	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	w	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae/bayanus</i>	HB20	+	-	-	+	+	-	-	-	+	w	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fungos semelhantes a leveduras</b>																								
<i>Aureobasidium</i> sp.	HB07	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+	+	-	-	-	
	HB08	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
	HB11B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	w	-	-	
	HB14	-	-	-	+	w	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
	HB41	-	-	-	+	-	+	-	w	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
	HB44	-	-	-	+	-	+	-	-	w	+	+	-	-	w	-	-	-	w	-	-	-	-	
	HB26A	-	-	-	+	w	+	w	w	+	-	+	-	+	w	-	-	+	-	-	-	-	-	
	HB47	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	w	+	w	+	-	-	-	
	HB78A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	HB64	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
<i>Aureobasidium pullulan-like</i>	HB30	+	-	-	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
	HB21A	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
<i>Levedura preta</i>	HB28	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	w	-	-	-	+	-	-	-	-	

**TABELA 5:** Continuação - Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Levedura preta fermentadora</i>	HB49	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-					
	HB51	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+					
	HB45	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-			-					
<i>Hormonema</i> sp.	HB23	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-					
	HB76C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	-	-					
<i>Hormonema schizolunatum-like</i>	HB16	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-					
<i>Itersoniilia perplexans</i>	HB85A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	W	-	W			
	HB54A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		-	+	+	-	+	-	W			
<i>Itersoniilia perplexans-like</i>	HB85B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+	-		+	+	-	-	-	-				
<i>Tilletiopsis</i> sp.	HB58	-	-	-	+	+	W	+	-	+	-	-	+	+	+	W	-	-	+	+	-	-	-	-	
<b>Basidiomicetos</b>																									
<i>Bullera</i> sp.	HB91	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	W	+	+		W	-	+	W	-	-	-	-
<i>Bullera pseudoalba</i>	HB67	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>Bullera-variabilis-like</i>	HB24B	-	-	-	+	W	-	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	W	-	-	-	-	-	-	
<i>Bullera alba</i>	HB78C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+	-	+	W	-	-		
<i>Cryptococcus</i> sp <sub>1</sub>	HB80	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	W	W	-	W	
<i>Cryptococcus</i> sp <sub>2</sub>	HB87	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Cryptococcus humicola-like</i>	HB34	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	

**TABELA 5:** Continuação - Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB76A	-	-	-	+	-	+	+	-	+	w	+	+	+	+	-	w	-	+	+	+	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB18	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	HB11A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	w	+	-	-	-	-	
<i>Cryptococcus laurentii-like</i>	HB12A	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	w	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Filobasidium floriforme-like</i>	HB26B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Pseudozyma sp.</i>	HB27A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	w	+	+	+	w	w	-	+
	HB27B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	w	-	+	+	+	+	w	w	-	w	
	HB97A	-	-	-	+	+	w	+	+	+	+	+	-	w	w	w	w	+	+	-	w	w	-	+
<i>Rhodotorula sp.</i>	HB29	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	HB21B	-	-	-	+	w	w	+	-	+	+	-	+	+	w	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	HB93V	-	-	-	+	+	w	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	HB90	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB95	-	-	-	+	+	+	+	+	+	w	-	-	+	w	-	-	-	+	-	-	w	-	-
<i>Sporobolomyces sasicola-like</i>	HB24A	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	w	+	w	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	HB63	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	w	+	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces salmonicolor-like</i>	HB75	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	w	+	w	w	-	-	+	w	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	HB94	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	w	+	-	-	+	-	-	-	-

**TABELA 5:** Continuação - Perfil bioquímico das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	HB96	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	w	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tremella brasiliensis-like</i>	HB89	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Tremella folliacea</i>	HB12B	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	w	-	+	+	w	-
<i>Trichosporon pullulans</i>	HB37	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+				-	+	+	-	-
<i>Trichosporon pullulans-like</i>	HB31	-	-	-	+	+	+	+	+			+	-	+	+	+			-	-	-	+	-
	HB85C	-	-	-	+	+	+	+	+			+	-	+	w				-	+	-	-	-

---

+, assimilação do carboidrato; W, fraca assimilação; - negativa assimilação

**TABELA 6:** Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Linhasgens	Nº-	Crescimento a 25°C	Crescimento a 30°C	Crescimento a 37°C	Crescimento a 40°C	Crescimento a 42°C	Assimilação de Nitrato	Assimilação de Nitrito	Assimilação de L-lisina	Assimilação de Creatina	Assimilação de Creatinina	Produção de Urease	Crescimento em NaCl 10%	Crescimento em NaCl 16%	Crescimento em Glicose 50%	Produção de compostos amilóides
<b>Ascomicetos</b>																
<i>Candida</i> spp.	HB13	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	-
	HB22	+	-	w	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	W	-
	HB43	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	W	+	-	-	-
	HB53	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-	-	-
	HB60A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	HB69	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	w	+	-
	HB71	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	w	+	-
<i>Candida colliculosa-like</i>	HB79	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	HB57	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	W	+	-

**TABELA 6:** Continuação - Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB48	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	W	+	-
<i>Candida famata var. flareri</i>	HB74	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida glabrata-like</i>	HB61	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	W	+	-
<i>Candida glabrata</i>	HB73	+	+	+	+	w	-	-	-	-	-	+	W	W	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB55	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB88	+	+	-	w	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Candida insectorum</i>	HB97B	+	+	W	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Candida robusta</i>	HB17A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	-	+	-
	HB17B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	W
	HB54B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	HB60B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Candida robusta-like</i>	HB25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Candida santjacobiensis-like</i>	HB10	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Candida tenuis</i>	HB15	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	W
<i>Debaryomyces occidentalis - like</i>	HB83	+	+	+	w	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	HB68A	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	HB68B	+	+	+	w	-	-	-	+	-	-	+	w	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus-like</i>	HB70	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

**TABELA 6:** Continuação - Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Pichia scolyti-like</i>	HB66	+	+	+	w	-	-	-	+	-	-	-	w	w	+	-
	HB62A	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	-	w	w	w	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HB19	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	w	-
<i>Saccharomyces cerevisiae/bayanus</i>	HB20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-
<b>Fungos semelhantes a leveduras</b>																
<i>Aureobasidium sp.</i>	HB07	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	HB08	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	w	+	-	+	-
	HB11B	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	HB14	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	w	w	-	+	-
	HB41	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
	HB44	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	HB26A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	HB47	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	w	w	w	-
	HB78A	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	w	w	w	-
	HB28	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	w	+	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	HB64	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Aureobasidium pullulan-like</i>	HB30	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	w	+	-
	HB21A	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	w	-	-	-	-

**TABELA 6:** Continuação - Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Levedura preta fermentadora</i>	HB49	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	HB51	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	HB45	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Hormonema sp</i>	HB23	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	HB76C	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	w	-	-	-
<i>Hormonema schizolunatum-like</i>	HB16	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Itersoniilia perplexans</i>	HB85A	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	HB54A	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	w	+	-
<i>Itersoniilia perplexans-like</i>	HB85B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Tilletiopsis sp.</i>	HB58	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<b>Basidiomicetos</b>																
<i>Bullera sp.</i>	HB91	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	-	-	-
<i>Bullera pseudoalba</i>	HB67	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bullera-variabilis-like</i>	HB24B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	-	w	-
<i>Bullera alba</i>	HB78C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Cryptococcus sp<sub>1</sub></i>	HB80	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	w	-	-
<i>Cryptococcus sp<sub>2</sub></i>	HB87	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus humicola-like</i>	HB34	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-



**TABELA 6:** Continuação - Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB76A	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	-	+	-
	HB11A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	-	-
<i>Cryptococcus laurentii-like</i>	HB12A	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Filobasidium floriforme-like</i>	HB26B	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Pseudozyma sp.</i>	HB27A	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	w	-
	HB27B	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	HB97A	+	+	w	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	HB29	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	w	+	w	w	-
<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	HB21B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	HB93V	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	HB90	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB95	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Sporobolomyces sasicola-like</i>	HB24A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	HB63	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces salmonicolor-like</i>	HB75	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	w	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	HB94	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	-	-

**TABELA 6:** Continuação - Perfil bioquímico/fisiológico das leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	HB96	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	w	-	-	-
<i>Tremella brasiliensis-like</i>	HB89	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Tremella folliacea</i>	HB12B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Trichosporon pullulans</i>	HB37	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Trichosporon pullulans-like</i>	HB31	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
	HB85C	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-

+, positivo; W, fraco; -, negativo

### **4.3 Taxonomia molecular de leveduras**

#### **4.3.1 Sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA**

As linhagens HB55 e HB88 foram gentilmente seqüenciadas e analisadas por Jesus P. Ramos no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Suas seqüências podem ser vistas no apêndice 8.1.1 e 8.1.2.

#### **4.4 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático extracelular**

O perfil da atividade enzimática das leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis* está apresentado na tabela 7 e na figura 1.

**TABELA 7:** Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Linhagens	Nº-	Beta-galactosidase	Amilase	Esterase	Lipase	Caseinase	Gelatinase	Celulase	Xilanase	Celobiase
<i>Candida</i> spp.	HB13	-	-	-	-	-	-	-	-	W
	HB22	W	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB43	+	-	-	++	-	-	-	-	+
	HB53	+	-	W	++	-	+	-	-	+
	HB60A	-	-	-	++	-	-	+	-	+
	HB69	-	-	-	++	-	-	-	-	+
	HB71	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Candida colliculosa-like</i>	HB79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida famata</i> var. <i>flareri</i>	HB74	-	-	-	W	-	-	-	-	W

**TABELA 7:** Continuação - Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Candida glabrata</i>	HB73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W
<i>Candida glabrata-like</i>	HB61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W
<i>Candida insectorum</i>	HB97B	+	-	-	++	-	-	-	-	-	+
<i>Candida robusta</i>	HB17A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB17B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HB54B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	HB60B	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+
<i>Candida robusta-like</i>	HB25	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Candida santjacobensis-like</i>	HB10	-	+	-	++	+	-	-	-	-	-
<i>Candida tenuis</i>	HB15	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	HB68A	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+
	HB68B	-	-	-	++	-	-	+	-	-	+
<i>Debaryomyces polymorphus-like</i>	HB70	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+
<i>Debaryomyces occidentalis - like</i>	HB83	-	-	-	++	-	++	++	-	-	++
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HB55	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+

**TABELA 7:** Continuação - Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

	HB88	-	-	-	++	-	++	-	-	+
<i>Pichia scolyti-like</i>	HB66	+	+	-	++	++	+	-	-	-
<i>Pichia scolyti-like</i>	HB62A	-	-	-	++	-	-	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae/bayanus</i>	HB20	-	++	-	-	-	-	-	-	W
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HB19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aureobasidium</i> sp.	HB07	-	-	+	++	+	-	-	+	W
	HB08	-	+	+	+	+	-	-	+	W
	HB11B	++	+	+	-	++	++	-	++	-
	HB14	-	+	W	W	+	+	++	-	W
	HB41	-	-	+	++	+	+	++	++	W
	HB44	-	+	-	++	+	-	++	-	W
	HB26A	+	-	+	W	-	+	++	+	W
	HB47	W	+	+	++	-	-	++	++	W
	HB78A	++	++	-	++	++	++	++	-	++

**TABELA 7:** Continuação - Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Aureobasidium pullulans</i>	HB64	-	+	-	++	+	-	-	-	W
<i>Aureobasidium pullulans-like</i>	HB21A	W	-	+	W	++	++	++	+	++
	HB30	W	-	W	-	+	-	++	W	+
<i>Levedura preta</i>	HB28	-	-	++	W	+	+	++	W	W
<i>Levedura preta fermentadora</i>	HB49	-	-	-	++	-	++	++	-	+
	HB51	-	-	+	++	++	-	++	W	+
	HB45	++	-	++	W	+	+	++	+	W
<i>Hormonema schizolunatum-like</i>	HB16	++	-	W	W	++	++	W	-	+
<i>Hormonema spp.</i>	HB23	++	-	++	W	+	-	++	W	+
	HB76C	++	-	++	++	++	-	++	-	++
<i>Itersonilia perplexans</i>	HB85A	-	-	W	++	-	++	-	W	+
	HB54A	+	+	-	-	++	-	++	++	++
<i>Itersonilia perplexans-like</i>	HB85B	++	+	-	W	+	-	+	W	-
<i>Tilletiopsis sp.</i>	HB58	-	-	+	++	-	-	-	-	+
<i>Bullera sp.</i>	HB91	-	-	-	-	-	++	W	-	+
<i>Bullera pseudoalba</i>	HB67	++	-	++	+	-	++	-	-	+

**TABELA 7:** Continuação - Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

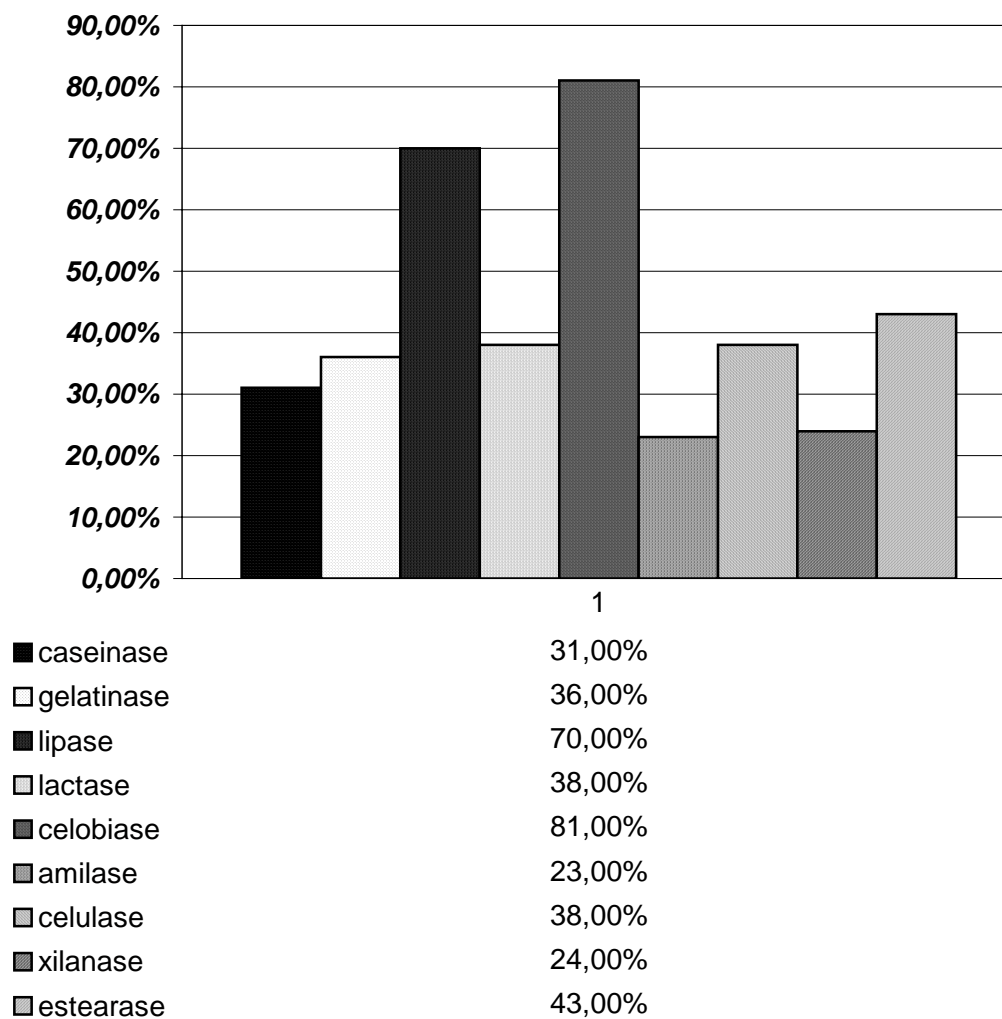
<i>Bullera-variabilis-like</i>	HB24B	+	-	-	W	-	+	-	-	+
<i>Bullera alba</i>	HB78C	-	+	++	++	-	-	W	-	+
<i>Cryptococcus</i> sp <sub>1</sub>	HB80	+	-	-	++	-	++	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp <sub>2</sub>	HB87	+	-	++	++	-	-	-	-	+
<i>Cryptococcus humicola-like</i>	HB34	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	HB76A	-	-	-	++	-	++	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB18	++	-	++	++	+	-	-	-	++
	HB11A	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii-like</i>	HB12A	++	-	++	++	+	-	W	-	++
<i>Filobasidium floriforme-like</i>	HB26B	++	+	++	++	-	++	-	-	+
<i>Pseudozyma</i> spp.	HB97A	-	-	W	++	-	++	+	W	W
	HB27B	++	-	W	++	++	++	-	+	W
	HB27A	+	-	W	++	-	++	-	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp.	HB29	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	HB21B	-	-	++	++	-	++	+	-	-



**TABELA 7:** Continuação - Perfil enzimático das culturas de leveduras isoladas de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*.

<i>Rhodotorula minuta</i>	HB93V	-	-	++	-	-	-	-	-	W
<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	HB90	-	++	W	-	-	-	-	-	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB95	-	-	++	-	-	-	+	-	W
<i>Sporobolomyces sasicola-like</i>	HB24A	+	-	W	W	-	++	-	-	W
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	HB63	-	-	-	++	-	+	-	-	+
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	HB75	-	-	+	++	-	+	-	-	W
<i>Sporobolomyces roseus</i>	HB94	-	-	++	-	-	-	+	-	W
<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	HB96	-	-	-	-	-	-	-	-	W
<i>Tremella brasiliensis-like</i>	HB89	-	-	-	++	-	-	-	-	++
<i>Tremella folliacea</i>	HB12B	+	-	++	+	-	+	W	-	+
<i>Trichosporon pullulans</i>	HB37	-	+	-	W	-	-	++	-	+
<i>Trichosporon pullulans-like</i>	HB31	-	++	+	++	+	-	+	W	W
	HB85C	+	+	-	++	+	+	++	W	W

++, forte atividade; +, atividade positiva; W, fraca atividade; -, negativa atividade



**Figura 1:** Percentagem absoluta do perfil enzimático avaliado nas linhagens isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

A hidrólise enzimática da celulose tem sido extensivamente estudada, entretanto pobremente compreendida. Trinta e oito por cento (32 isolados) das 84 cepas foram capazes de produzir a enzima celulase, sendo a maioria pertencente aos grupos dos fungos semelhantes a leveduras (“yeast-like”). A baixa percentagem de leveduras verdadeiras capazes de hidrolisar a celulose (24%; 15 de 61 isolados) contrasta com a sua capacidade de utilizar celobiose (77%; 47 de 61 isolados) como fonte nutricional enzimática. Outro ponto interessante em torno deste tema é que a maioria das cepas que foram hábeis para hidrolisar celulose não foram capazes de assimilar celobiose. Este comportamento poderia pressupor uma outra finalidade para a capacidade de hidrólise da celulose, tal como o envolvimento com mecanismos de patogenicidade em plantas. A produção de enzimas com capacidade de degradar componentes da parede celular de plantas como parte de um sistema de fitopatogenicidade tem sido descrita para alguns fungos filamentosos e fungos semelhantes a leveduras, considerando estes microorganismos como patógenos oportunistas de plantas (Lalaoui *et al.*,2000).

Outro contexto interessante, baseia-se no fato de que a ação da celulase é devido ao sinergismo entre três tipos de enzimas: as endoglicanases, que clivam aleatoriamente sítios internos da cadeia polissacarídea da celulose, produzindo oligossacarídeos; as exoglicanases, que clivam no fim dessas cadeias de oligo ou polissacarídeos, liberando glicose ou celobiose; e por fim as  $\beta$ -glucanases (celobiases) que clivam a celobiose para produzir glicose. Existe uma grande variabilidade na especificidade destas enzimas. Especula-se que a ação sinérgica das endoglicanases e exoglicanases poderia facilitar a

utilização de celobiose como fonte de nutriente. Se isto for verdade, resíduos de celobiose que não são assimilados por microorganismos degradadores de celulose poderiam ficar disponíveis para outros microorganismos que são capazes apenas de degradar celobiose. Portanto podemos supor que, na natureza, e mais especificamente no microhabitat do filoplano, a degradação da celulose é realizada por um consórcio de microorganismos celulolíticos e não celulolíticos que coexistem em mutualismo, onde a atividade de cada um contribui para a hidrólise final da celulose (Lynd *et al.*, 2002).

A busca por microorganismos produtores de celulase é uma importante alternativa aos métodos químicos convencionais de obtenção desta enzima a partir da madeira processada (Lynd *et al.*, 2002). Microorganismos simultaneamente produtores de celulase e celobiase são muito valiosos para a indústria quando se deseja a decomposição do material celulósico para a produção de açúcares fermentáveis, redução da viscosidade em polpas ou suspensões e aumento do rendimento na extração em produtos de origem vegetal. Cinco isolados do filoplano apresentaram esta característica: *Debaryomyces occidentalis*-similar (HB83), *Aureobasidium* sp. HB78A, *Aureobasidium pullulans*-similar HB21A, *Hormonema* sp. HB76C, *Itersonilia perplexans* HB54A. Mais estudos sobre a capacidade de utilização de outros substratos de celulose, além da caracterização da atividade celulolítica destes isolados, são necessários para serem encaminhados a processos de otimização de sua atividade.

Glicosidases, tais como a celobiase e a  $\beta$ -xilosidase, produzidas por microorganismos, têm sido reportadas em processos bioquímicos de

precursores e componentes relevantes para o aroma em alimentos (Rodriguez *et al.*, 2004). Em virtude disso, Rosi *et al.* (1994) pesquisando essa atividade, realizaram uma extensiva triagem de 20 gêneros de leveduras isoladas de vinhedos para a produção de celobiase, sendo que os mais expressivos resultados foram encontrados nos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces*. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados em nosso trabalho.

Hemicelulose é a segunda fonte de nutriente mais abundante disponível na natureza, caracterizada como polímeros constitutivos das sementes e componente estrutural da parede celular de plantas, onde a xilana é a mais abundante das hemiceluloses (Beg *et al.*, 2001; Kulkarni *et al.*, 1999). Cerca de 65% (15 de 23 isolados) dos fungos semelhantes a leveduras isoladas neste estudo foram capazes de hidrolisar a xilana, ao contrário da atividade apresentada pelas leveduras verdadeiras, que não ultrapassou 10% (5 dos 61 isolados) do total. Strauss *et al.* (2001) utilizando mesma metodologia com leveduras isoladas de uvas obteve semelhante resultado. A maioria dos isolados xilanolíticos são também celulolíticos, incluindo a maioria das linhagens de fungos semelhantes a leveduras. Somente 7% (6 de 84 isolados) das cepas testadas foram xilanolíticas sem ação celulolítica, mas o oposto foi verificado em 21% (18 de 84 isolados) das cepas. Tem sido proposto que a camada de xilana pode ser uma importante proteção para as fibras de celulose (Uffen, 1997). Se isto for verdade, leveduras capazes de produzir ambos os tipos de enzimas poderiam ter uma vantagem ecológica sobre aquelas que somente produzem celulase. Isolados xilanolíticos poderiam ser importantes

para facilitar o acesso de cepas não-xilanolíticas para as fibras de celulose. Este provável sistema de mutualismo para obtenção de compostos energéticos, entre leveduras e fungos semelhantes a leveduras do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*, está de acordo com as explicações relatadas por Middelhoven (1997) sobre a utilização de componentes da planta como fonte de carbono para leveduras do filoplano.

Quanto ao perfil biotecnológico das cepas fortemente produtoras de xilanase em meio sólido nos testes de triagem, as linhagens de *Aureobasidium* sp. HB07, HB08 e HB11 são ótimas produtoras de xilanase, mas não de celulase, apresentando-se como uma importante fonte destas enzimas para a indústria de papel, onde a ausência de celulase é requerida. Por outro lado, a incorporação de celulases e xilanases nas dietas fornecidas a animais domésticos é hoje corrente na indústria de rações, pois aumenta o valor nutricional de cereais como aveia, cevada e trigo para animais monogástricos, já que estes não dispõem de um sistema digestivo similar aos dos ruminantes. A inclusão de celulases e xilanases em regimes a base de cereais ricos com polissacarídeos não amiláceos tende a reduzir a viscosidade intestinal, melhorando as taxas de crescimento e o nível de saúde (Reis *et al.*, 2001). Os isolados de fungos semelhantes a leveduras HB41, HB26A, HB45, HB21A, HB47 e HB54A são capazes de secretar ambas as enzimas, sendo ótimos candidatos para estudos de caracterização, purificação e imobilização de celulases e xilanase para fins de utilização na indústria de rações.

Enzimas envolvidas na degradação do amido são comuns em fungos e são freqüentemente usadas como fonte industrial de amilases (MacGregor,

1996). A produção de amilases foi encontrada em somente 23% (19 de 84 cepas) de nossos isolados, sendo mais corrente nas leveduras verdadeiras (53%; 10 de 61 isolados). A baixa percentagem de leveduras isoladas do filoplano produtoras de amilases está de acordo com o relatado na literatura (Middelhoven, 1997). Buzzini & Martini (2002) em ensaios de triagem realizados com isolados da floresta tropical brasileira, tiveram também raros resultados de ascomicetos e basidiomicetos produtores de amilase em meio sólido. Visto que a obtenção de leveduras capazes de produzir quantidades comercialmente aceitáveis de amilase, quando comparado a fungos filamentosos, ainda é um desafio, foram selecionados quatro isolados que apresentaram condições necessárias para serem submetidos a testes de produção enzimática em fermentadores contendo diferentes compostos amiláceos: *Saccharomyces cerevisiae/bayanus* HB20, *Aureobasidium* sp. HB78A, *Rhodotorula mucilaginosa*-similar HB90 e *Trichosporon pullulans*-similar HB31. Microrganismos, em especial fungos, produtores de amilase, protease e xilanase vêm sendo implementados como fonte alternativa de complexos multienzimáticos para rações mais eficientes e econômicas. A suplementação com enzimas hidrolíticas extracelulares nas dietas melhora a eficiência de produção de aves pelo aumento da digestão de produtos de baixa qualidade e redução da perda de nutrientes nas fezes (Reis *et al.*, 2001). Três isolados apresentaram essas três características: *Itersonilia perplexans* HB54A, *Aureobasidium* sp. HB11B e HB08. Estas distintas linhagens são ótimas aspirantes a testes de otimização da sua atividade catalítica, visando a aplicação destas enzimas na indústria de beneficiamento de rações.

Proteases produzidas por leveduras têm sido muito estudadas devido a suas implicações na indústria vinícola (Strauss *et al.*, 2001) e pelo grande interesse clínico como enzimas alvo para estudos de fator de patogenicidade (Rodrigues *et al.*, 1999, Chakrabarti *et al.*, 1991). A atividade enzimática proteolítica foi avaliada em dois diferentes meios: Agar caseína (caseinase) e Meio Malte Gelatina (gelatinase). O meio Malte Gelatina foi o meio que apresentou maior eficiência como teste de triagem e detecção da atividade proteolítica, onde 19 cepas de leveduras verdadeiras foram consideradas positivas (+) ou fortemente positivas (++), enquanto somente 8 linhagens demonstraram atividade caseinolítica. O oposto foi observado com linhagens de fungos semelhantes a leveduras, apresentando 11 e 18 isolados capazes de hidrolisar gelatina e caseína, respectivamente. A ampla diversidade de enzimas com atividade proteolítica pode explicar os resultados discrepantes obtidos com cada meio. A produção de protease foi detectada em ambos os meios por somente 11 das 45 linhagens, 8 delas pertencentes ao grupo dos “yeast-like”. Este resultado pressupõe que estas 11 linhagens possivelmente produzem proteases com ampla especificidade de substrato e, portanto, poderiam ser empregadas em formulações de detergentes (Rao *et al.*, 1998). Estudos sobre a viabilidade da purificação, bem como a estabilidade quanto a variações de temperatura e pH são indispensáveis para avaliar sua adequada viabilidade como componente de formulações em detergentes. Cinco isolados, *Aureobasidium* sp. HB11B e HB78A, *Aureobasidium pullulans*-similar HB21A, *Hormonema schizolunatum*-similar HB16 e *Pseudozyma* sp. HB27B apresentaram forte atividade proteolítica em ambos os meios testados, fato



raro em leveduras não patogênicas (Phaff *et al.*, 1994). O estudo da ação da atividade dessas enzimas produzidas em valores extremos de pH é de grande importância para aplicação na indústria alimentícia, visto que processos de fermentação de bebidas alcoólicas, por exemplo, requerem atividade proteolítica em pHs básicos (Nelson & Young, 1987).

Cerca de 70% (59 cepas) dos nossos isolados foram lipolíticos, sendo que deste percentual 71% (42 cepas) são forte produtor de lipase. Este alto percentual ressalta o filoplano como uma boa fonte de microrganismos produtores desta enzima. Buzzini & Martini (2002) numa triagem de aproximadamente 400 linhagens isoladas de água, solo, insetos e partes de plantas da floresta tropical brasileira obtiveram um percentual de 40% (160 cepas) de seus isolados com perfil lipolítico. O percentual de leveduras com afinidade ascomicética produtoras de lipase isoladas foi semelhante ao reportado por estes autores, entretanto 70% (21 de 30 isolados) das nossas cepas com afinidade basidiomicética produziam lipase, contrastando com os 14% obtidos por eles. Outra importante diferença foi em relação ao número de fungos semelhantes a leveduras produtores de lipase: 87% (20 de 23 cepas) de nossas linhagens são produtoras, sendo que 48% (11 de 23 cepas) destes são forte produtoras, enquanto os autores citados acima obtiveram fungos semelhantes a leveduras lipolíticos em apenas 43% dos isolados classificados neste grupo.

Outro fato interessante trata-se da utilização do tween 20 e tween 80 como substratos indutores de lipase e esterase, respectivamente. Como citado anteriormente, muitos autores afirmam que tween 20 e tween 80 servem como

substrato tanto para lipase quanto para a esterase, enquanto outros defendem o contrário, ainda estando longe de se chegar a um consenso sobre o assunto. Nossos resultados nitidamente ressaltam a controvérsia sobre este tema. Cerca de 39% (33 de 84 cepas) dos nossos isolados utilizam apenas tween 20 como substrato para produção enzimática, ao passo que 8% (7 de 84 cepas) utilizam apenas tween 80. Entretanto, 36% (30 de 84 cepas) das linhagens utilizam ambos os substratos para produção enzimática. Este último dado pode a princípio parecer notório, mas quase 60% (50 de 84 isolados) das cepas que produzem estas enzimas utilizam apenas um dos substratos. Maiores estudos são necessários para compreender o mecanismo correto de indução enzimática causada por estes substratos.

Detergentes multienzimáticos biodegradáveis produzidos com derivados de microrganismos para a higienização de instrumentos cirúrgicos e hospitalares em geral, sistemas sanitários e cloacais vêm despertando um crescente interesse devido as suas garantias de eficácia e segurança (Gandhi, 1997). Vários consórcios de enzimas são utilizados na composição destes produtos, como amilase, lipase, celulase e proteases. Em diversos isolados foi detectada a alta produção dessas enzimas. As linhagens de *Aureobasidium* sp. HB78A, HB47 e HB44, de *Trichosporon pullulans*-similar HB31 e *Itersonilia perplexans* HB85A secretam grandes quantidades de lipase, amilase e celulase conjuntamente, característica desejada para otimização de precursores biológicos de detergentes enzimáticos. Microrganismos produtores de várias enzimas de interesse, em grande quantidade, são mais valiosos que restritos produtores de uma enzima em particular, pois apresentam uma versatilidade de

aplicações industriais, além de serem economicamente mais rentáveis (Van Beilen & Li, 2002; Panke & Wubbolts, 2002).

A ocorrência de esterases de interesse industrial também foi avaliada. Somente os isolados basidiomicetos e os fungos semelhantes a leveduras secretaram a enzima, sendo que 28% (15 de 53 isolados) demonstraram forte atividade, estando de acordo com os achados por Buzzini & Martini (2002) em isolados da mata atlântica Brasileira, que obtiveram atividade esterase apenas nestes grupos, não tendo também nenhum ascomiceto positivo. As esterases também estão envolvidas no processo de formação de compostos aromáticos para a indústria vinícola. As leveduras produtoras de esterase e não produtoras de celobiase, enzima envolvida na liberação de flavonóides, são de grande importância para esse segmento (Zarzoso *et al.*, 1998). As leveduras *Aureobasidium* sp HB11B e *Rhodotorula glutinis*-similar HB21B apresentam essa característica, destacando-se como ótimas candidatas para estudos de purificação e caracterização enzimática dessa propriedade.

Embora a produção industrial de  $\beta$ -galactosidase em biorreatores usando células imobilizadas da levedura *Kluyveromyces fragilis* esteja bem avançada (Russo *et al.*, 1997; Vasiljevic & Jelen, 2001), outras espécies de leveduras ainda permanecem inexploradas quanto a sua possibilidade de utilização como fonte desta enzima. A atividade enzimática  $\beta$ -galactosidase ou lactase em nossos isolados foi mais associada aos basidiomicetos do que os isolados ascomicetos ou aos fungos semelhantes a leveduras, porém com percentuais mais baixos que os reportados por Strauss *et al.* (2001), utilizando metodologia similar. A maioria dos isolados que apresentaram alta produção

dessa enzima nos ensaios de triagem realizados não secretava amilase, uma enzima indesejada em estudos de viabilidade biotecnológica de linhagens produtoras de  $\beta$ -galactosidase na indústria de laticínios (Vasiljevic & Jelen, 2001). Somente um isolado *Rhodotorula* sp. HB29 secreta  $\beta$ -galactosidase, sem secretar amilase, lipase e proteases. Esta característica fenotípica capacita este isolado para processos de purificação e mobilização desta enzima para aplicação em testes de biodisponibilidade de soluções medicamentosas em indivíduos intolerantes à lactose.

O mercado de enzimas de interesse biotecnológico está crescendo exponencialmente, comparado aos processos químicos convencionais de obtenção de enzimas, devido a significativa redução de custos, sendo reconhecido como um importante componente de desenvolvimento industrial sustentável (Van Beilen & Li, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho revelam o filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis* como uma importante fonte de leveduras e fungos semelhantes a leveduras com características enzimáticas desejáveis ao enfoque biotecnológico, sendo alguns desses isolados ótimos candidatos para estudos de viabilidade em processos industriais.

#### **4.5 Detecção de substâncias antimicrobianas**

Leveduras micocinogênicas, ou seja, leveduras que possuem biotipo “killer” apresentam um potencial para sua aplicação em processos fermentativos (Kurtzman & Fell, 1998; Zargoc *et al.*, 2001), biotipagem de leveduras patogênicas (Buzzini & Martini, 2001) e também no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de micoses humanas (Séguy *et al.*,

1998), embora certas micocinas já tenham sido relatadas com atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas patogênicas (Izgu & Altinbay, 1997). As 84 leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram avaliadas para a sua capacidade de secretar micocinas, através de testes de inibição *in vitro* de 11 cepas de leveduras patogênicas ao homem de diferentes espécies, descritas na tabela 8. Das 84 linhagens, 11 apresentaram caráter micocinogênico, sendo destes quatro são leveduras verdadeiras: dois ascomicetos (*Kodamaea ohmeri* HB55 e *Kodamaea ohmeri* HB88) e dois basidiomicetos (*Bullera* sp. HB91 e *Trichosporon pullulans-like* HB31). Neste teste inicial de triagem, a levedura patogênica mais inibida foi a *Candida albicans* ATCC 1880, sendo antagonizada por seis cepas diferentes. Dois isolados antagonistas destacaram-se: *Kodamaea ohmeri* HB55 e HB88, cada uma inibindo seis das onze cepas testadas, sendo que dentre estes estavam quatro linhagens de diferentes variedades de *Cryptococcus neoformans*.

A incidência de leveduras micocinogênicas em substratos isolados no Brasil tem sido relatada na literatura. Buzzini & Martini (2000) verificaram a ocorrência de leveduras micocinogênicas em uma coleção de 438 leveduras e fungos semelhantes a leveduras pertencentes em 96 espécies diferentes, isoladas de diversos substratos da floresta tropical brasileira, apresentando deste total 170 cepas (39%) com atividade “killer”. Esse maior percentual encontrado, quando comparado aos nossos resultados (13%; 11 de 84 isolados), deve-se ao tipo de substrato utilizado. Estes autores coletaram além de flores, frutos, que possuem sabidamente alto percentual de leveduras

micocinogênicas (Magliani et al., 1997), ao passo que folhas ainda não haviam sido reportados.

Relatos de atividade micocinogênica contra cepas de *Cryptococcus neoformans* foram realizados por Boekhout & Scorzetti (1996), Criseo et al. (1999) e Cenci et al. (2004), tanto em amostras clínicas quanto ambientais. Boekhout & Scorzetti (1996) foram capazes de distinguir dentre os isolados de *C. neoformans*, as variedades *gatti* de *neoformans* utilizando a susceptibilidade dos mesmos a diferentes leveduras produtoras micocinas, porém seu resultado expressou a incapacidade das linhagens utilizadas nesse estudo em possuir ampla atividade antagonista contra variedades de *Cryptococcus neoformans*. Por outro lado, as cepas *K. ohmeri* HB55 e HB88, isoladas do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*, foram capazes de inibir todas as variedades de *C. neoformans*, apresentando um melhor potencial para utilização como substâncias antifúngicas. Os demais autores citados acima, testaram a atividade micocinogênica apenas contra isolados de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

Leveduras basidiomicéticas com atividade micocinogênica têm sido descritas na literatura, embora se reconheça a predominância de ascomicetos com essa propriedade antagonista. Golubev & Nakase (1997) reportaram a atividade de leveduras balistosporogênicas do gênero *Bullera* contra diversas espécies de leveduras verdadeiras. Dentre os nossos isolados de afinidade basidiomicética, apenas os isolados *Bullera* sp. HB91 e *Trichosporon pullans*-similar HB31 tiveram perfil micocinogênico.













**TABELA 8:** Continuação - Seleção de linhagens micocinogênicas em meio YM-MB.

HB85B	<i>Itersonilia perplexans-like</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB85C	<i>Trichosporon pullulans-like</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB87	<i>Cryptococcus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB88	<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+
HB89	<i>Tremella brasiliensis-like</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB90	<i>Rhodotorula mucilaginosa-like</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB91	<i>Bullera sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
HB94	<i>Sporobolomyces roseus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Atividade micocinogênica positiva, (+) Atividade micocinogênica fraca, - Atividade micocinogênica negativa

ATCC – American Type Culture Collection

NRRL – ARS Culture Collection

#### **4.5.1 Avaliação da atividade micocinogênica de linhagens selecionadas contra leveduras patogênicas ao homem**

Os dois isolados selecionados do teste de triagem contra leveduras patogênicas ao homem (*Kodamaea ohmeri* HB55 e HB88) tiveram sua identidade confirmada pelo sequenciamento da região D1/D2 do gene ribossômico 26S (rDNA). As cepas HB55 e HB88 tiveram 98% e 100% de similaridade com a cepa tipo *Kodamaea ohmeri* (ATCC46053), respectivamente, tendo suas seqüências depositadas no GeneBank com número de acesso AY614706 (cepa HB55) e AY614707 (cepa HB88). As seqüências podem ser vistas no apêndice 1.

A atividade micocinogênica das linhagens *Kodamaea ohmeri* HB55 e HB88 foi testada agora em Agar YEPG e Agar YM-MB em diferentes valores de pH contra as mesmas leveduras patogênicas, como demonstrado na tabela 9. Pequenas diferenças foram observadas nos resultados, sendo que a maioria nos ensaios que apresentavam fraca atividade micocinogênica. As cepas de *Kodamaea ohmeri* apresentaram melhores resultados no meio YM-MB com pH ácido (3,0 a 4,0) contra isolados de *Candida*. Estas mesmas cepas inibiram a todos os 4 isolados as três variedades de *Cryptococcus neoformans* (var. *neoformans*, *grubii* e *gattii*) em todos os meios e pHs testados. Para confirmar esta atividade contra isolados de *C. neoformans*, a atividade foi testada contra isolados obtidos de coleções, amostras ambientais e amostras clínicas em Agar YM-MB com pH 4,0, como apresentado na tabela 10. HB55 e HB88 inibiram todas as cepas de *C. neoformans* testadas, demonstrando o potencial biotecnológico desses dois isolados na pesquisa de novas drogas para o

tratamento da criptococose. Embora as micocinas não estejam viáveis para serem diretamente usadas como antibióticos sistêmicos devido a sua forte antigenicidade, podendo resultar num choque anafilático, atualmente tem-se sugerido seu uso como anticorpos anti-idiotípicos monoclonais, reconhecidos sobre suas relevantes vantagens sobre os métodos de vacinação utilizando DNA recombinante (Polonelli et al., 1997; Magliani et al., 1997). Diferenças na susceptibilidade entre cepas de *Candida* pertencentes a mesma espécie pode ser atribuída à diferença de sensibilidade às micocinas produzidas pelas cepas HB55 e HB88. *Candida albicans* UFRGS 0051-L, *Candida tropicalis* NRRL Y-12968 e UFRGS 0056-L foram inibidas ou pela HB55 ou pela HB88, sugerindo que as toxinas produzidas sejam diferentes. Entretanto, experimentos de inibição cruzada entre HB55 e HB88 foram negativos, o que representa que a toxina provavelmente seja a mesma para ambos os isolados, reforçando a necessidade de maiores confirmações para essa hipótese. Especulações sobre esta variabilidade de ação do fenótipo “killer” concentram na seletividade dos receptores situados na parede celular das células sensíveis serem característicos de cada variedade, assim como existem alterações estruturais nos receptores  $\beta$ -1,6-glicana específicos para cada micocina produzida por linhagens micocinogênicas de *Saccharomyces cerevisiae* (Magliani et al., 1997; Santos et al., 2000).

#### 4.6 Teste de cura do fenótipo “killer”

O teste de cura das cepas HB55 e HB88 foi realizado, onde avaliou-se a capacidade de cura da característica micocinogênica após sucessivos repiques perto da temperatura máxima de crescimento (42°C) de ambos os isolados durante um mês. Após o tratamento térmico, 100 colônias obtidas de cada micocinogênica foram testadas contra os 4 isolados das três variedades de *Cryptococcus neoformans* para avaliar a sua capacidade de produção da toxina. Todos os isolados mantiveram a característica e, interessante, 81% dos clones obtidos da cepa HB55 produziram halos de inibição maiores que a cepa original. Entretanto, os clones da linhagem *Kodamaea ohmeri* HB88 apresentaram também diferenças na atividade, porém muito pouco evidentes. Estes resultados indicam que a produção da micocina por ambos os isolados é relativamente estável, o que é desejável para aplicações biotecnológicas. Soares & Sato (1999), avaliaram a capacidade de perda ou cura da característica “killer” em duas cepas micocinogênicas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas no Brasil, utilizando protocolo similar de cura. Ambos os isolados tiveram seu biotipo “killer” inativado a 40°C. Comparando esse perfil com nossas linhagens, somente ressalta a expressiva e estável característica, indispensável em processos químicos de otimização e purificação da biomolécula ativa. Magliani *et al.* (1997) afirmaram que o desaparecimento da propriedade micocinogênica, num curto espaço de tempo, por leveduras isoladas de frutos tropicais deve-se à perda de plasmídeos ou a elevadas temperaturas de incubação, tornando estes isolados não aptos para processos biotecnológicos, ao contrário das cepas HB55 e HB88.





**TABELA 9:** Continuação - Atividade micocinogênica das linhagens *Kodamaea ohmeri* HB55 e *Kodamaea ohmeri* HB88 contra leveduras patogênicas humanas em Agar YEPG e Agar YM-MB em diferentes valores de pH.

<i>Candida parapsilosis</i> UFRGS 0053-L	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> UFRGS 0054-L	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 1880	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> UFRGS 0050-L	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> UFRGS 0051-L	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> NRRL Y-12968	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-
<i>Candida tropicalis</i> UFRGS 0055-L	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> UFRGS 0056-L	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> C.n. = *Cryptococcus neoformans*

<sup>b</sup> valores de pH

+ Atividade micocinogênica positiva, (+) Atividade micocinogênica fraca, - Atividade micocinogênica negativa

ATCC – American Type Culture Collection; NRRL – ARS Culture Collection; IMUFRJ – Coleção de Culturas de Leveduras do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ; UFRGS – Departamento de Microbiologia/UFRGS;

**TABELA 10:** Atividade micocinogênica de *Kodamaea ohmeri* HB55 e HB88 contra diferentes isolados de *Cryptococcus neoformans*.

Designação <sup>a</sup>	Fonte / Informações adicionais	HB 55			HB 88				
		YM - MB		YEPG	YM - MB		YEPG		
		3.0 <sup>b</sup>	4.0	5.0	3.0	4.0	5.0		
<i>C. neoformans</i>	ATCC 32045	Sorotipo A, var. <i>grubii</i>	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 28957	Sorotipo D, var. <i>neoformans</i>	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 28958	Sorotipo D, var. <i>neoformans</i>	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 24065	Sorotipo B, var. <i>gattii</i>	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 32269	Sorotipo B, var. <i>gattii</i>	ND	+	ND	ND	ND	+	ND
	ATCC 48184	Sorotipo híbrido AD	ND	+	ND	ND	ND	+	ND
	ATCC 24066	Sorotipo C, var. <i>gattii</i>	ND	+	ND	ND	ND	+	ND
	CBiot Az19	Sorotipo A, var. <i>grubii</i> / Isolado ambiental	ND	+	ND	ND	ND	+	ND
	CBiot A45	Sorotipo D, var. <i>neoformans</i> / Isolado ambiental	ND	+	ND	ND	ND	+	ND

**TABELA 10:** Continuação - Atividade micocinogênica de *Kodamaea ohmeri* HB55 e HB88 contra diferentes isolados de *Cryptococcus neoformans*.

CBiot AL5	Sorotipo B, var. <i>gattii</i> / Isolado clínico	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
CBiot HSL3	Sorotipo B, var. <i>gattii</i> / Isolado clínico	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
CBiot Az26	Sorotipo B, var. <i>gattii</i> / Isolado ambiental	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
CBiot AL13	Sorotipo B, var. <i>gattii</i> / Isolado clínico	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
CBiot Az32	Sorotipo B, var. <i>gattii</i> / Isolado ambiental	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND

<sup>a</sup> ATCC – American Type Culture Collection; Cbiot – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul/UFRGS

<sup>b</sup> valores de pH

+ Atividade micocinogênica positiva, (+) Atividade micocinogênica fraca, - Atividade micocinogênica negativa, ND = não determinado

## 5. CONCLUSÕES

Foram isoladas 61 cepas de leveduras verdadeiras e 23 de fungos semelhantes a leveduras, totalizando 84 isolados obtidos do filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*. Dentre as leveduras verdadeiras, 31 linhagens possuem afinidade ascomicética e 30 afinidade basidiomicética. A maioria dos fungos semelhantes a leveduras pertencem ao grupo das leveduras pretas ou “black yeasts”.

Todos os isolados foram identificados fenotipicamente pela metodologia convencional. As linhagens denominadas como *Candida* sp., *Bullera* sp., *Cryptococcus* sp., *Pseudozyma* sp., *Rhodotorula* sp., *Aureobasidium* sp., *Hormonema* sp., *Tilletiopsis* sp., apenas puderam ser identificadas ao nível de gênero com a metodologia utilizada. Dois isolados com características micocinogênicas tiveram sua identificação confirmada pelo sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rDNA: *Kodamaea ohmeri* HB55 e *Kodamaea ohmeri* HB88. Em três linhagens de fungos semelhante a leveduras foi possível

apenas classificá-las como leveduras pretas fermentadoras, comumente conhecidas como “black-yeasts”.

Cerca de 13% dos nossos isolados tiveram perfil micocinogênico contra cepas patogênicas leveduriformes. As cepas HB55 e HB88 foram selecionadas para testes de purificação de sua toxina, devido a sua capacidade de inibir a levedura patogênica humana *Cryptococcus neoformans*, tendo demonstrado atividade contra todas as linhagens deste fungo testadas.

A partir dos dados apresentados neste trabalho podemos concluir que programas de “screening” ou triagem para a seleção de microrganismos capazes de produzir biomoléculas ativas continuam a ser um importante método para a biotecnologia. Avaliou-se a produção de celulase, celobiase, xilanase, amilase,  $\beta$ -galactosidase, protease (gelatinase e caseinase), esterase e lipase pelos 84 isolados do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*. Várias linhagens apresentaram bom perfil biotecnológico, com predominância de glicosidases e lipases. Destaca-se a cepa *Itersonilia perplexans* HB85A, que foi encaminhada para processos de purificação e imobilização da enzima lipolítica em suporte de resina, para produção em escala semi-industrial.

A utilização do filoplano de plantas como substrato de escolha na busca de linhagens com potencial biotecnológico é uma das principais conclusões deste trabalho. Alcançou-se um inesperado número de isolados representando mais de 40 espécies de leveduras e fungos semelhantes a leveduras em

apenas 7 folhas. Além disso, a facilidade de escolha devido à diversidade botânica no nosso país, a simplicidade das técnicas de isolamento dos microrganismos associados e a escassez de estudos sobre seu potencial são algumas das vantagens da escolha desse substrato para selecionar linhagens com perfil biotecnológico. O filoplano esconde um imenso universo de microrganismos ainda inexplorados, característicos da espécie e localização geográfica da planta, tornando-se um reservatório natural para pesquisas biotecnológicas.

Por fim, todas as linhagens selecionadas foram depositadas na coleção de leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas para futuros estudos da toxina “killer” secretada pelas cepas HB55 e HB88, identificadas como *Kodamaea ohmeri*, poderíamos citar:

- a) Verificar se a característica é cromossômica, plasmidial ou codificada por dsRNA plasmidial associado a partículas viras (“virus-like particles”). Após, sequenciar o gene responsável e caracterizar a toxina.
- b) Estudar o mecanismo de ação da toxina e caracterizar os receptores celulares ( $\beta$ -glicanases) nas células sensíveis.
- c) Purificar e comparar o espectro de ação da toxina concentrada com antifúngicos de referência.
- d) Determinar o peso molecular, seqüência de aminoácidos e similaridade estrutural da toxina concentrada e purificada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, J. *et al.* The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 328-336, 1997.
- AKTAS, E.; YIGIT, N.; AYYILDIZ, A. Esterase activity in various *Candida* species. **Journal of International Medical Research**, Northampton, v. 30, p. 322-324, 2002.
- ALVES, M.H. *et al.* Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 325-330, 2002.
- ATLAS, R.M.; BARTHA R. **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. 4<sup>a</sup> ed. Redwood: Benjamin/Cummings Science Publishing, 1997. p. 401-402.
- BAB'EVA, I.P.; CHERNOV I.Y. Geographic aspects of yeast ecology. **Physiology and General Biology Reviews**, London, v. 9, p. 1-54, 1995.
- BARNETT J.A.; PAYNE R.W.; YARROW D. **Yeasts, characteristics and identification**. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1139p.
- BARNETT J.A.; PAYNE R.W.; YARROW D. **Yeasts, characteristics and identification**. 4<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.
- BECERRA, M. *et al.* New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. **Protein Engineering**, Oxford, v. 14, p. 379-386, 2001.
- BEG, Q.K. *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 35, p. 147-149, 1997.
- BOWLES, L.L. Amylolytic enzymes. **Food Science Technology**, London, v. 75, p. 105-129, 1996.
- BRAGA, A. A.; MORAIS, P.B.; LINARDI V.R. Screening of yeasts from Brazilian Amazon Rain Forest for extracellular proteinases production. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 353-359, 1998.



BUZZINI, P.; MARTINI, A. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from Brazilian rain Forest. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 607-611, 2000.

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

CARVALHO, P. *et al.* Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos insaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTORIA R. *et al.* *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 7-17, 2001.

CENCI, E. *et al.* A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 953-961, 2004.

CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. In vitro proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 114, p. 163-168, 1991.

COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P.  $\beta$ -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 17, p. 259-289, 1993.

CRISEO, G.; GALLO, M.; PERNICE, A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans var. neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. **Mycoses**, Berlin, v. 42, p. 601-608, 1999.

DE HOOG, G.S.; GUARRO J. **Atlas of clinical fungi**. Netherlands: CBS, 1995. p. 79-521.

DE HOOG, G.S.; YURLOVA, N.A. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 65, p. 41-54, 1994.

DI MENNA, M.E. The antibiotic relationships of some yeasts from soil and leaves. **Journal of General Microbiology**, London, v. 27, p. 249-257, 1962.

DO CARMO-SOUZA, L. Distribution of yeasts in nature. In: Rose A.H., Harrison J.S. (eds) **The yeasts**. London: London Academic Press, 1969. p. 79-106.

FANGRUI, M; MILFORD, A.H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, p. 1-15, 1999.

FICHTENBAUM, C.J. *et al.* Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 30, p. 749-756, 2000.

FICKERS, P. *et al.* Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 63, p. 136-142, 2003.

FANGRUI, M.; MILFORD, A.H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, p. 1-15, 1999.

FRANZOT S.P.; SALKIN I.F. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 838-840, 1999.

FREDLUND, E. *et al.* Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, p. 395-402, 2002.

FRICKER-HIDALGO, H.S. *et al.* Evaluation of *Candida* ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 1647-1649, 2001.

GANDHI, N.N. Application of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 74, p. 621-634, 1997.

GANTER, P.F.; STARMER, W.T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. **Ecology**, Oxford, v. 73, p. 54-67, 1992.

GOLUBEV, W.; NAKASE, T. Mycocinogeny in the genus *Bullera*: taxonomic specificity of sensitivity to the mycocin produced by *Bullera sinensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, p. 59-64, 1997.

GUNDLLAPALLI, S.B. *et al.* Different genetic backgrounds influence the secretory expression of the *LKA1*-encoded *Lipomyces kononenkoae*  $\alpha$ -amylases in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 651-656, 2002.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D.G. Rapid Diazonium Blue B test to detect basidiomycetes yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 31, p. 204-208, 1981.

HALTRICH, D. *et al.* Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAWKSWORTH, D.L. *et al.* **Ainsworth & bisby's dictionary of the fungi**. 8<sup>a</sup> ed. London: Ed. CAB International, 1995. 616p.

IONITA, A. *et al.* Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 147-151, 1997.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on Gram-positive bacteria. **Microbios**, Cambridge, v. 89, p. 15-22 1997.

KADEMI, A. *et al.* thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 332-338, 1999.

KREGGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. 1082 p.

KULKARNI, N.; SHENDEY, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 411-456, 1999.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 4<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

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

LACHANCE, M.A. *et al.* *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella occidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, five new related yeast species from flowers and associated insects. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 48, p. 1431-1443, 1998.

LACHANCE, M.A. *et al.* Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 1, p. 1-8, 2001.

LALAOUI, F. *et al.* Cell wall-degrading enzymes produced *in vitro* by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, p. 727-733, 2000.

LAST, F.T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**. London, v. 38, p. 221-239, 1955.

LAST, F.T.; PRICE, D. Yeasts associated with living plants and their environs. In: A.H. Rose & J.S Harrison (ed.). **The yeasts**. London: Academic Press., 1969. p. 183-218.

Li, H. *et al.* Yeast populations on the tropical timber tree species *Milicia excelsa*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, p. 322-326, 1995.

LEVI, G.C. Management of opportunistic infections in HIV+ patients: contrasts between Europe & South America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 2, p. 118-127, 1996.

LOWES K. F. *et al.* Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1066-1076, 2000.

LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, p. 506-577, 2002.

MCCORMACK, P.J.; WILDMAN H.G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeast-like fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 927-931, 1994.

MACGREGOR, E.A. Structure and activity of some starch metabolizing enzymes. **Progress in Biotechnology**, New York, v. 12, p. 109-124, 1996.

MACFADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000, 912p.

MAGLIANI W. *et al.* Yeast Killer Systems. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 10, p. 369-400, 1997.

MAKOWER, M.; BEVAN, E.A. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In: International Congress on Genetics, 11<sup>th</sup>, 1963, London. Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress on Genetics, London: Academic Press, 1963. v. 1, p. 202-203.

MIDDELHOVEN, W.J. Identity and biodegradative abilities of yeast isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, p. 81-89, 1997.

MIDDELHOVEN, W.J.; DE HOOG, G.S. *Hormonema schizolunatum*, a new species of dothideaceous black yeasts from phyllosphere. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, p. 297-305, 1997.

MILLER, M.W. Yeasts in food spoilage and update. **Food Technology**, Chicago, p. 76-80, 1979.

MITCHELL T.G.; PERFECT J.R. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, p. 515-548, 1995.

MOLINARI, F. *et al.* Isolation of a novel carboxylesterase from *Bacillus coagulans* with high enantioselectivity toward racemic esters of 1,2-O-isopropylidenedeglycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 551–556, 1996.

MOREIRA, G.F. *et al.* Production of amylases by *Aspergillus tamaritii*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 157-162, 1999.

NEUFELD, P.M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico**. Rio de Janeiro: ed. Programa Nacional de Controle de qualidade, 1999. 240 p.

NELSON, G.; YOUNG, T.W. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 133, p. 1461-1469, 1987.

PAIVA, A.L.; BALCAO, U.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, p. 187 – 204, 2000.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. 4ª ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. 275 p.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M.G. Enzyme technology and bioprocess engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 111-116, 2002.

PFALLER, M.A. *et al.* Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 1437-1441, 1988.

PHAFF, H.J. *et al.* *Candida caseinolytica* sp. nov., a new species of yeast occurring in necrotic tissue of *Opuntia* and *Stenocereus* species in the Southwestern United States and Baja California, Mexico. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 44, p. 641-645, 1994.

PLOU, F.J. *et al.* Analysis of tween 80 as an esterase / lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 12, p. 183-186, 1998.

POLONELLI, L. *et al.* Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal antidiotipic antibodies. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 4, p. 142-146, 1997.

RAO, M.B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 597-635, 1998.

REEDER, R.H. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 1, p. 466-474, 1989.

REIS, T. *et al.* Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases do *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus*: sua utilização na suplementação de dietas à base de trigo e frangos de carne. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 96, p. 125-134, 2001.

RINGS, H.M. *et al.* Lactase: origin, gene expression, localization and function. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 14, p. 775-797, 1994.

ROBBS, P.G. **Ecologia e taxonomia de leveduras associadas a uma plantação de abacaxi do estado do Rio de Janeiro**. 1986. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

RODRIGUES, M.L.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, I.R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, p. 293-301, 1999.

RODRIGUEZ, M.E. *et al.* Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 84-95, 2004.

ROSA, C. *et al.* *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae* and *Kodamaea anthophila*, three new related yeast species from ephemeral flowers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 49, p. 309-318, 1999.

ROSA, C. *et al.* Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 271-273, 2003.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, p. 519-527, 1994.

RUDEK, W. Esterase activity in *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 8, p. 756-759, 1978.

RUSSO, P. *et al.* Increase in  $\beta$ -galactosidase activity in a non-isothermal bioreactor utilizing immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*: fundamentals and applications. **Research in Microbiology**, Paris, v. 148, p. 271-281, 1997.

SANTOS, A. *et al.* (1-6)- $\beta$ -D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1809-1813, 2000.

SANTOS, M.G.G.R. *et al.* Yeast in Biotechnology. In: Progress in microbial ecology. Rio de Janeiro: Eds. M.T. Martins, M.I.Z. Sato, J.M. Tiedje, L.C. Mendonça-Hagler, J. Dobereiner & P.S. Sanchez. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 571-576.

SCHMITT M. J.; BREINIG F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 257-276, 2002.

SÉGUY N. *et al.* Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*: Perspectives in the control of pneumocystosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 22, p. 145-149, 1998.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 627-662, 2001.

SLIFKIN, M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 4626-4628, 2000.

SOARES, G.; SATO, H. Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaipuara commercial brands of yeast. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 253-257, 1999.

STARMER, W.T. *et al.* The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 783-796, 1987.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, 1991.

STRAUSS, M.L.A. *et al.* Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 182-190, 2001.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4<sup>a</sup> ed., San Francisco: Freeman, 1995. 1000 p.

TRINDADE, R.C. *et al.* Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, London, v. 25, p. 294-300, 2002.

UFFEN, R.L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 1-6, 1997.

VALENTE, P. **Identificação convencional e molecular de leveduras isoladas de filoplano de bromélias**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2000, 92p.

VAN BEILEN, J.B.; LI, Z.; Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 338-344, 2002.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Stockholm, v. 2, p. 75-85, 2001.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 329 – 350, 1993.

VON TIGERSTROM, R.G.; STELMASCHUK, S. The use of tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 35, p. 511-514, 1989.

WALKER, G.M.; MCLEOD, A.H.; HODGSON V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 213-222, 1995.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds.) **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 77-100.

YUCESOY, M.; MAROL S. Determination of esterase of *Candida* varieties. **Mikrobiyoloji**, Kasym, v. 37, p. 59-63, 2003.

YURLOVA, N.A.; DE HOOG, G.S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, p. 141-147, 1997.

ZAGORC T. *et al.* Indigenous wine killer yeast and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 441-451, 2001.

ZARZOSO, B. *et al.* The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 143-148, 1998.

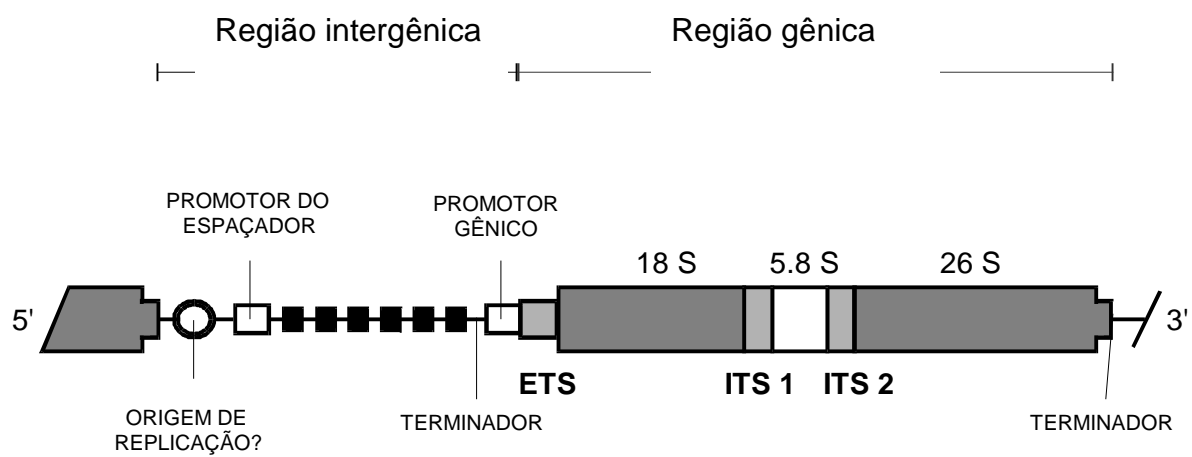


## 8. APÊNDICES

### 8.1 Taxonomia molecular de leveduras

A taxonomia convencional de leveduras nem sempre alcança uma identificação correta, não somente a nível de espécie, mas às vezes também quanto ao gênero. Por esse motivo a biologia molecular vem sendo cada vez mais usada como uma importante ferramenta auxiliar na identificação de leveduras, principalmente de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas essenciais para identificação, como a visualização de esporos. Além disso, é uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (Kurtzman & Robnett, 1998).

O rDNA (Figura 2) é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum (Valente *et al.*, 1999). A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5,8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em relação aos genes 18S, 5.8S e 5S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se seqüenciada e observou-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia (Kurtzman & Robnett, 1998).



**Figura 2:** rDNA em eucariontes, segundo Reeder (1989)

### 8.1.1 Sequência completa dos segmentos D1/D2 do gene 26S do isolado HB 88 (*Kodamea ohmeri*)

5' tgctcagtaccggcgagttacggcaaagctcaaatttgaaatcccccggggagttg  
taatttgaagattgCGTcttggaggcgaccgtgtctatgttccttggAACaggacgtca  
cagaggggtgagaatcccgtgCGGCacggcccccggtccttataaggcgctctcgacga  
gtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtgggtggtaaattccatctaaagctaaata  
cagggcgagagaccgatagcgaacaagtacagtgatggaaagatgaaaagcactttgaa  
aagagagtgaaacagcacgtgaaattgttgaaaggggaagggcatgccgtcagattgtca  
gtgtgggtaagaagcgggggtacaaagactgtggaacgtggccctcggtgta 3'

### 8.1.2 Sequência completa dos segmentos D1/D2 do gene 26S do isolado HB55 (*Kodamea ohmeri*)

5' gctcggaaagagacggggcatgaactgcgctataacacacgagggccacgttccaca  
gtctttgtaccccgcttcttaccacactgacaatctgacggcatgcccttcctttca  
acaatttcacgtgctgtttcactctcttttcaaagtgttttcatctttccatcactgt  
actgttcgctatcggctctctcgctgtattagcttagatggaatttaccaccact  
ttgagctgcattcccaaacaactcaactcgtcgagagcgccttataaggagccgggggc  
cgtgccgcacgggattctcaccctctgtgacgtcctgttccaaggaacatagacacggt  
cgctccaagacgcaatcttcaaattaaactccccgggggattc 3'

## 8.2 Preparo de reagentes

### Solução tampão citrato de sódio

Um dos requisitos para a obtenção de resultados confiáveis nos testes de avaliação da característica “killer” em meios com diferentes pH era a manutenção do pH dos substratos que foram acidificados. Esses quesitos foram garantidos pela adição de solução tampão, que assegurou a faixa de pH no valor proposto.

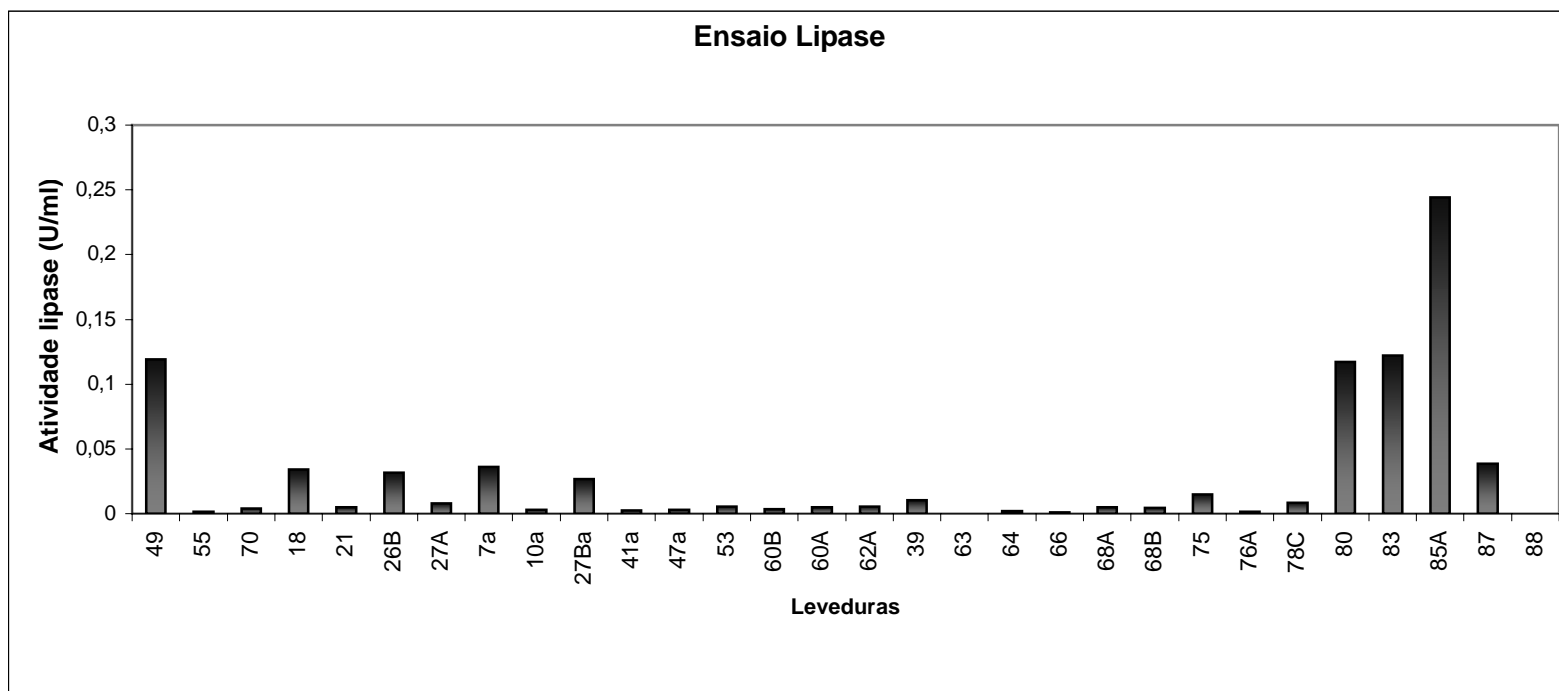
O preparo dessa solução se faz em dois momentos: primeiro preparou-se uma solução de ácido cítrico 0,1M (21,01g em 1000 mL), que foi denominada de solução A, e uma segunda solução, constituída de citrato de sódio (29,41g em 1000 mL), que foi denominada de solução B (Abranches, 1997). Prontas essas soluções, aplicou-se a seguinte mistura das soluções para obter a faixa de pH desejada:

X mL de solução A	Y mL de solução B	Faixa de pH*
40,5 mL	3,5 mL	3,0
31,5 mL	18,5 mL	4,2
28 mL	22 mL	4,4

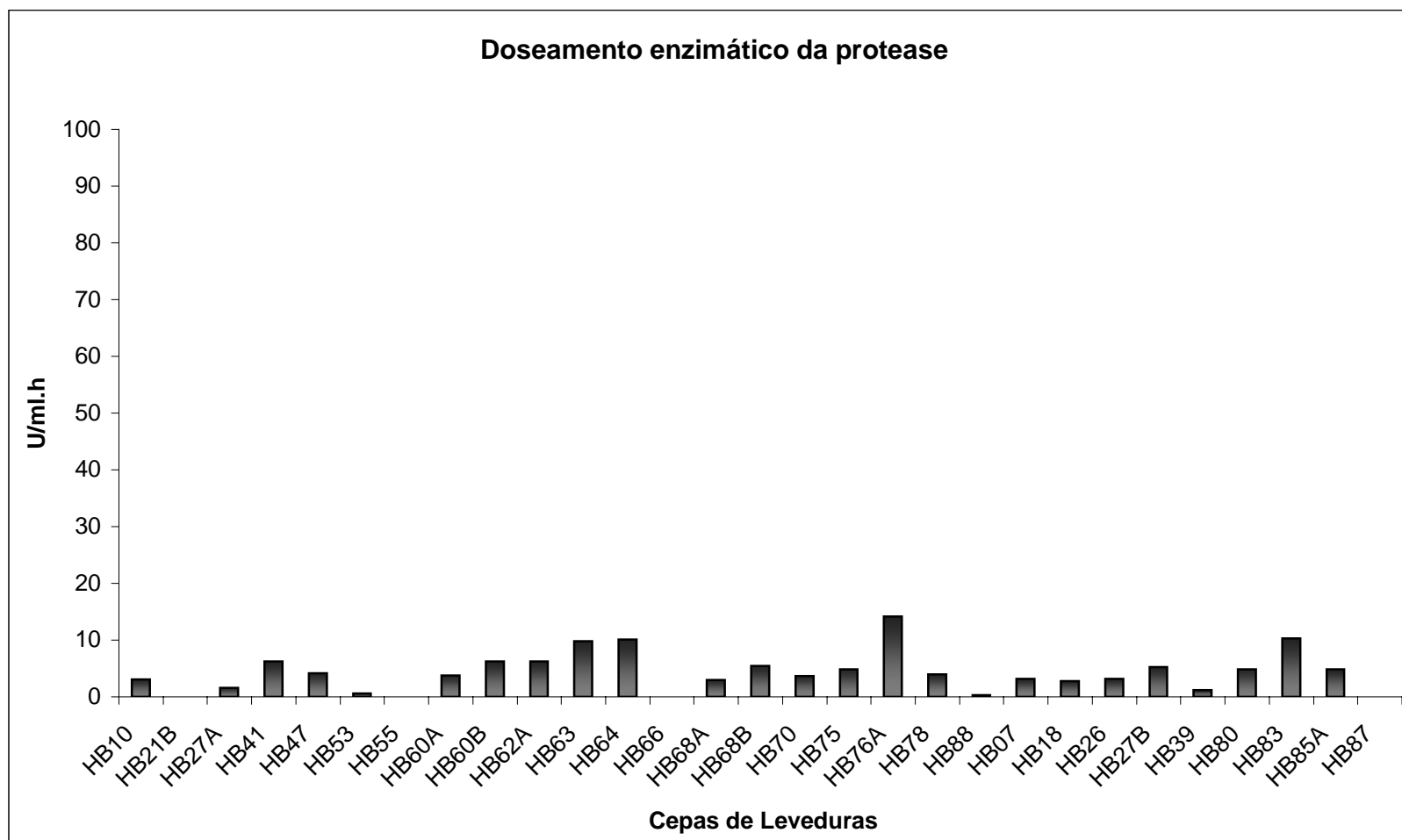
\* obtida após a mistura das soluções e diluição em 1000 mL de água destilada

### 8.3 Doseamento da atividade lipolítica de linhagens selecionadas

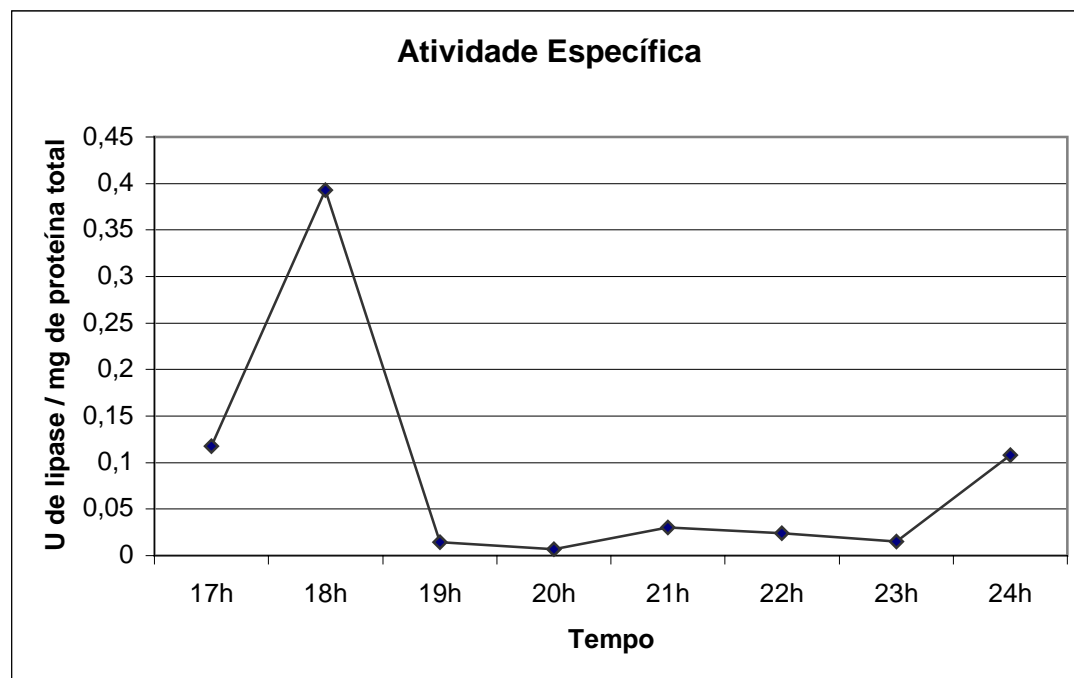
Cerca de 70% dos nossos isolados foram lipolíticos, sendo que deste percentual 79% são forte produtores de lipase. Esta valiosa característica apresentada por estes isolados estimulou o Centro de Biotecnologia desta mesma universidade, através da aluna de mestrado Roberta Bussamara, a realizar a caracterização enzimática, utilizando como substrato palmitato de p-nitrofenil, de 30 isolados que apresentaram resultados mais expressivos. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto a partir de palmitato de p-nitrofenil (Figura 3). Esta metodologia evidenciou o grande potencial biotecnológico de 10 linhagens, ressaltando a cepa *Itersonilia perplexans* HB85A. A determinação quantitativa da protease foi avaliada (caseinase) para fins de estocagem da lipase em nível industrial, pois a mesma não deve ser degradada com facilidade. A análise da quantidade de protease também foi verificada por Bussamara, que demonstrou o baixo perfil proteolítico desses isolados (Figura 4), de acordo com o ensaio de “screening” realizado neste trabalho, quando comparado com ensaios utilizando mesma metodologia. A cepa *Itersonilia perplexans* HB85A, em processos de produção de lipase em alta escala (via fermentação), apresentou um aumento de quatro vezes a sua atividade específica num pico de 18h (Figura 5), resultado expressivo para microrganismos não recombinantes em bioprocessos industriais. A lipase produzida por esta linhagem encontra-se atualmente em processos de purificação e imobilização em suporte de resina, para a produção de biodiesel à nível de larga escala.



**Figura 3:** Determinação lipase com palmitato de p-nitrofenil (pNPP-Sigma)



**Figura 4:** Determinação da caseinase pelo método colorimétrico da azocaseína.



**Figura 5:** Perfil da atividade específica da lipase por hora de fermentação



## 9. VITA

### 9.1 Dados Pessoais

Nome: Alexandre Meneghello Fuentefria

Nascimento: 29/09/1977, Cachoeira do Sul/RS – Brasil

CPF: 80430899068

Endereço residencial: Rua Alberto Silva, 24 - Ap. 302 Cristo Redentor, Porto Alegre, RS - Brasil – Caixa Postal: 91370000

Telefone: (51) 33407762 / (51) 96991515

E-mail: [amf77@terra.com.br](mailto:amf77@terra.com.br)

### 9.2 Formação Acadêmica / Titulação

2003-2004 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

1998-2002 - Graduação em Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

### 9.3 Áreas de Atuação

1. Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Identificação de leveduras
2. Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Micologia
3. Microbiologia aplicada, Microbiologia Médica
4. Microbiologia Industrial
5. Análise e Controle de Qualidade de Medicamentos
6. Análises Clínicas

### 9.4 Produção Científica

#### 9.4.1 Resumos em anais de eventos

**Fuentefria, Alexandre Meneghello;** Valente, Patrícia. Plant cell-wall hydrolyzing potential of yeast and yeast-like fungi isolated from phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. In: **11<sup>th</sup> International Congress On Yeasts**, 2004, Rio de Janeiro. 2004.

Landell, Melissa; Mautone, Juliana; **Fuentefria, Alexandre Meneghello;** Valente, Patrícia. Caracterização Fenotípica de leveduras isoladas de

Bromélias na praia da Pedreira, Parque Itapuã/RS. In: **VI Congresso Brasileiro de Micologia**. Ouro Preto/MG, 2004.

Corbellini, Valeriano; **Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Valente, Patrícia; Scroferneker, Maria Lúcia. Detecção da atividade nitrorredutase de leveduras sobre 6-Nitrocumarina por cromatografia em camada delgada. In: **VI Congresso Brasileiro De Micologia**, Ouro Preto/MG, 2004.

Franskoviaki, Inélia; **Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Mercado, Luisa; Valente, Patrícia. Inibição de fungos patogênicos humanos e fitopatogênicos por leveduras isoladas de folhas do *Hibiscus rosa-sinensis*. In: **XVI Salão de Iniciação Científica**. Porto Alegre/RS, 2004.

Spanenberg, Andréia; Hartfelder, C.C.; **Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Valente, Patrícia. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas do leite in natura. In: **XVI Salão de Iniciação Científica**. Porto Alegre/RS, 2004.

Spanenberg, Andréia; Hartfelder, C.C.; **Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Valente, Patrícia. Diversidade de leveduras isoladas do leite bovino in natura no sul do Brasil. In: **VI Congresso Brasileiro de Micologia**. Ouro Preto/MG, 2004.

Spanenberg, Andréia; **Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Valente, Patrícia. Contagem e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas do leite bovino *in natura* no Rio Grande do Sul. In: **XVI Congresso Estadual de Medicina Veterinária**. Passo Fundo/RS, 2004.

**Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Franskoviaki, Inélia; Mercado, Luisa; Ramos, Jesus P.; Valente, Patrícia. Identificação fenotípica e molecular de cepas leveduriformes com capacidade antagonista contra fungos patogênicos humanos. In: **XIV Reunião de Genética de Microorganismos**. Gramado/RS, 2004.

**Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Franskoviaki, Inélia; Mercado, Luisa; Germano, Fernando; Valente, Patrícia. Atividade antagonista contra fungos patogênicos humanos de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de *Hibiscus sp.* In: **XXIII Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre/RS, 2003.

**Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Franskoviaki, Inélia; Mercado, Luisa; Germano, Fernando; Valente, Patrícia. Atividade antagonista contra fungos patogênicos humanos de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de *Hibiscus sp.* In: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, 2003.

**Fuentefria, Alexandre Meneghelo**; Franskoviaki, Inélia; Mercado, Luisa; Germano, Fernando; Valente, Patrícia. Detecção de enzimas extracelulares de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de *Hibiscus sp.* In: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, 2003.

Franskoviaki, Inélia; **Fuentefria, Alexandre Meneghello**; Mercado, Luisa; Valente, Patrícia. Inibição de fungos patogênicos humanos por leveduras micocinogênicas isoladas do filoplano de *Hibiscus sp.* In: **XV Salão de iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre/RS, 2003.

### 9.5 Artigos Completos em Periódicos

**Fuentefria, Alexandre M.**; Franskoviaki, Inélia; Mercado, Luisa W; Ramos, Jesus P; Vainstein, Marilene H; Valente, Patrícia. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by two killer yeast isolates from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, **IN PRESS**, 2004.

**Fuentefria, Alexandre M.**; Valente, Patrícia. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **Bioresource Technology**, USA, v.submit, 2004.

Perez, Leandro R.R.; **Fuentefria, Alexandre M.**; Steppe, Martin; Teixeira, Mário L.; Oppe, Tércio P.; Schapoval, Elfrides E.S. Validation of UV spectrophotometric method for the determination of piroxicam, tenoxicam and meloxicam in pharmaceutical dosage form. **Journal of AOAC International**, EUA, v.88, n. 1, **IN PRESS**, 2005.

Spanamberg, Andréia; Hartfelder, Claudia; **Fuentefria, Alexandre Meneghello**; Valente, Patrícia. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in South Brazil. **Acta scientiae**, Brasil, v. 32, n. 3, **IN PRESS**, 2004.