



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR LEVEDURAS
DE SOLOS RORAIMENSES

BOA VISTA, RR
2012

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

**PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR LEVEDURAS
DE SOLOS RORAIMENSES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Dr. Marcos José Salgado Vital.

BOA VISTA, RR

2012

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

A368p Alencar, Andréia da Silva.

Produção extracelular de enzimas hidrolíticas por leveduras de solos Roraimenses / Andréia da Silva Alencar. -- Boa Vista, 2012.
98 f : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Área de Concentração: Bioprospecção.

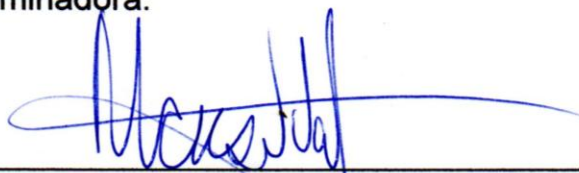
1 - *Cryptococcus* sp. 2 – *Rhodotorula* sp. 3 – *Yarrowia* sp. 4 - Biotecnologia
5 – PPBio. I – Título. II. – Vital, Marcos José Salgado (orientador).

CDU- 582.282.23

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

**Produção extracelular de enzimas hidrolíticas por leveduras de solos
roraimenses**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 21 de agosto de 2012 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



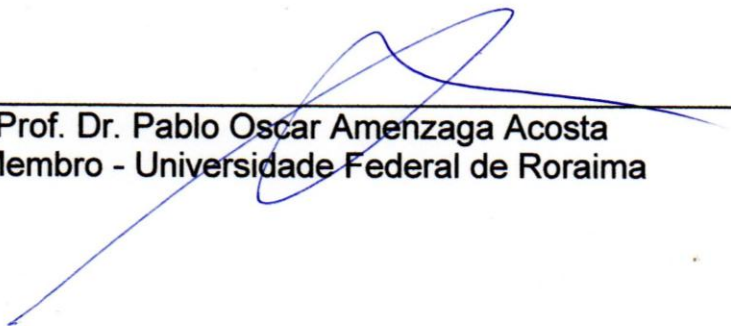
Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital
Orientador - PRONAT



Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva
Membro - Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. Fabiana Granja
Membro - Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Pablo Oscar Amenzaga Acosta
Membro - Universidade Federal de Roraima

Dedico à DEUS,
meu pai Batista,
minha mãe Iracema,
e aos meus irmãos Adrielson e Anderson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível.

Aos meus pais pela preocupação, carinho, educação e torcida nas horas difíceis.

Aos meus irmãos pelo carinho e ajuda.

Ao Guilherme de Lira, pela paciência e companheirismo.

À todos os meus amigos pelos momentos de descontração e palavras de incentivo.

Ao meu orientador, Marcos José Salgado Vital, pela oportunidade e orientação.

Aos bolsistas e ex-bolsistas de iniciação científica do laboratório de Microbiologia do CBio: Jafet Vieira, Mariana Camargo, Dina Mara Mildred, Eriza Hahn e Rodrigo Lopes por toda colaboração e convivência.

Aos biólogos Iran Melo e Mariçula Farias pelo auxílio e paciência.

Aos amigos e colegas de Mestrado, Suelen Belo, Erica Veras, Karuliny Maia, Priscila Azarak e José Julian Quitiaquez, pelos quais tenho imenso respeito e admiração.

Ao professor e amigo Miguel Ortega, mais conhecido como Miguelito, pelo imenso favor prestado durante uma de minhas viagens à Belo Horizonte para realização de estágio.

À professora Gardênia Cabral, vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, pelas palavras de carinho e encorajamento.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima.

À Universidade Federal de Minas Gerais pelas identificações e testes enzimáticos, em especial aos queridos Carlos Rosa, Carla Pataro, Camila Gotinjo, Raquel Sousa e Silvana Safar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos testes enzimáticos, em especial a Marilene Henning, Patrícia Valente, Amanda Pasinato e Glaci Ventura.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A todos eu agradeço imensamente pela diferença que fizeram em minha vida durante esta caminhada. OBRIGADA!!!!

“Se a vida às vezes dá uns dias de segundos cinza e o tempo tic-taca devagar, põe o teu melhor vestido, brilha teu sorriso, vem pra cá, vem pra cá!” (Do lado de cá – Chimarruts).

Música que marcou e virou tema entre as colegas de curso.

RESUMO

Nos últimos anos o mercado de enzimas tem crescido muito devido a sua utilização em reações específicas importantes para diversos setores industriais. Os microorganismos, em especial, as leveduras são capazes de produzir uma ampla variedade de enzimas, e assim, tornam-se cada vez mais interessantes para estudos da utilização dos seus compostos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá e Campus Cauamé, em Roraima. O processo de isolamento permitiu quantificar $6,4 \times 10^6$ UFC/g, contabilizadas em 883 colônias, agrupadas em 11 morfotipos, e identificadas dentro de quatro gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia*. Foram identificados *Cryptococcus podzolicus*, *Candida pseudointermedia* e *Rhodotorula mucilaginosa*; cinco isolados foram identificados como novas espécies, sendo quatro *Yarrowia* sp. e uma *Candida* sp., que estão em fase de descrição. Os isolados testados não produziram amilase e celulase pelos testes utilizados. A produção qualitativa de lipase foi observada em 36% dos isolados, representados por *Yarrowia* spp. (VR546, VR547, VR571 e VR572). A protease foi produzida por cerca de 90% dos isolados: *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 e VR558), *Candida* sp. (VR533), *Candida pseudointermedia* (VR544 e VR545) e *Yarrowia* sp. (VR546, VR547, VR571 e VR572). Três isolados de *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 e VR558) produziram xilanase e pectinase. O potencial multienzimático foi observado em 63% dos isolados, representados por *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 e VR558) e *Yarrowia* sp. (VR546, VR547, VR571 e VR572). Os resultados alcançados nesta pesquisa corroboram a importância das áreas protegidas como fontes de novas espécies, inclusive com especial interesse para a Biotecnologia.

Palavras-chave: *Candida* sp. *Cryptococcus* sp. *Rhodotorula* sp. *Yarrowia* sp. Biotecnologia. PPBio.

ABSTRACT

In recent years the market for enzymes has grown a lot due to their use in specific reactions important for several industrial sectors. The micro-organisms, in particular, the yeasts are able to produce a wide variety of enzymes, and so, become ever more interesting for studies the use of your compounds. This work aimed to assess the capacity of production of hydrolytic enzymes by yeasts isolated from soils of the Viruá National Park and the Campus of Cauamé, in Roraima. The isolation process allowed to quantify $6,4 \times 10^6$ UFC/g, grouped into 11 morphotypes, and identified within four genres: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Yarrowia*. Were identified *Cryptococcus podzolicus*, *Candida pseudointermedia* and *Rhodotorula mucilaginosa*; five isolates have been identified as new species, being four *Yarrowia* sp and one *Candida* sp, which are undergoing description. The isolates tested did not produce amylase and cellulase by tests used. Qualitative lipase production was observed in 36 % of the isolates, represented by *Yarrowia* spp. (VR546, VR547, VR571 e VR572). The protease was produced about 90% of the isolates: *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 and VR558), *Candida* sp. (VR533), *Candida pseudointermedia* (VR544 and VR545) and *Yarrowia* sp. (VR546, VR547, VR571 and VR572). Three isolates of *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 and VR558) produced xylanase e pectinase. The multienzymatic potential was observed in 63 % of the isolates, represented by *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 and VR558) and *Yarrowia* SP. (VR546, VR 547, VR571 and VR572). The results of this study confirm the importance of protected areas as sources of new species, including with special interest for biotechnology.

Keywords: *Candida* sp. *Cryptococcus* sp. *Rhodotorula* sp. *Yarrowia* sp. Biotechnology. PPBio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da estrutura do DNA ribossômico demonstrando as regiões espaçadoras (ETS, ITS1 e ITS2) e os genes presentes (18S, 5.8S e 26S).....	16
Figura 2	Grade do PPBio localizada no Parque Nacional do Viruá/RR destacando as 30 parcelas permanentes em branco.....	26
Figura 3	Módulo do PPBio localizada no Campus Cauamé/UFRR destacando as 19 parcelas permanentes em amarelo.....	27
Figura 4	Fluxograma das atividades realizadas na pesquisa.....	29
Figura 5	Grade do PPBio localizada no Parque Nacional do Viruá/RR destacando os seis pontos de coleta em cinco ambientes diferentes (losângulos).....	31
Figura 6	Pontos de coleta de amostras de solo na grade do PPBio do Parque Nacional do Viruá/RR.....	32
Figura 7	Módulo do PPBio localizada no Campus Cauamé/UFRR, destacando os cinco pontos de coleta em diferentes tipos de solo (losângulos).....	33
Figura 8	Pontos de coleta de amostras de solo na grade do PPBio do Campus Cauamé/RR.....	34
Figura 9	Esquema da amostragem de solo para isolamento de leveduras em parcelas do PPBio.....	35
Figura 10	Homogeneização, peneiramento e diferentes amostras compostas de solo por ponto coletado.....	36
Figura 11	Esquema da obtenção de concentrações de inóculos para isolamento de leveduras de solo.....	36
Figura 12	Procedimentos realizados nos testes fisiológicos e bioquímicos para a caracterização de leveduras: A- suspensão de células em água destilada; B- inoculação em meios líquidos; C- base do multinoculador; e, D- inoculação em meio sólido utilizando o multinoculador.....	38
Figura 13	Filograma da análise do sequenciamento dos domínios D1/D2 do rRNA de espécies de <i>Candida</i> , em destaque a inserção da fase sexuada de <i>C. hispaniensis</i> no clado Yarrowia.....	61
Figura 14	Teste de triagem de lipase por rodamina B utilizando isolados provenientes de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, caracterizado pela fluorescência (indicada pelas setas).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pontos de coleta de amostras de solo no Parque Nacional do Viruá/RR e frequência dos isolados de levedura.....	54
Tabela 2	Crescimento, fermentação e assimilação de fontes de nutrientes por leveduras isoladas de amostras de solo do Parque Nacional do Viruá/RR.....	56
Tabela 3	Identificação molecular das leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR através do sequenciamento do rDNA 26S.....	59
Tabela 4	Síntese da atividade enzimática qualitativa das leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.....	63
Tabela 5	Atividade enzimática qualitativa de pectinase em meio básico produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.....	65
Tabela 6	Atividade enzimática qualitativa de protease produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.....	67
Tabela 7	Atividade enzimática qualitativa de xilanase produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.....	68
Tabela 8	Atividade enzimática qualitativa de lipase produzida por leveduras do gênero <i>Yarrowia</i> isoladas do Parque Nacional do Viruá/RR.....	71
Tabela 9	Atividade enzimática quantitativa de lipase produzida por leveduras do gênero <i>Yarrowia</i> isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, por técnicas de titrimetria.....	72
Tabela 10	Atividade enzimática quantitativa de lipase por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, utilizando técnicas espectrofotométricas.....	73
Tabela 11	Atividade enzimática quantitativa de protease de leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, por técnicas de espectrofotometria.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEVEDURAS.....	14
1.2	TAXONOMIA DE LEVEDURAS.....	15
1.3	PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	16
1.3.1	Amilases	17
1.3.2	Celulases	18
1.3.3	Lipases	19
1.3.4	Pectinases	21
1.3.5	Proteases	22
1.3.6	Xilanases	23
1.4	LEVEDURAS DE SOLO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	24
1.5	RORAIMA E O PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE – PPBio.....	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	AMOSTRAGEM.....	30
3.1.1	Área de estudo	30
3.1.1.1	Parque Nacional do Viruá.....	30
3.1.1.2	Campus Cauamé/UFRR.....	32
3.1.2	Coleta	34
3.1.3	Processamento das amostras	35
3.1.4	Isolamento e agrupamento das leveduras	37
3.2	PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS LEVEDURAS.....	37
3.2.1	Testes fisiológicos e bioquímicos	38
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	40
3.3.1	Extração do DNA Total	40
3.3.2	Amplificação utilizando o iniciador EI1	41
3.3.3	Amplificação dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do rDNA....	42

3.3.4	Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.....	43
3.3.5	Análise das sequências.....	44
3.4	PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE ENZIMAS.....	44
3.4.1	Avaliação da produção de amilase.....	45
3.4.2	Avaliação da produção de celulase.....	45
3.4.3	Avaliação da produção de pectinase em pH 5.....	45
3.4.4	Avaliação da produção de pectinase em pH 7.....	46
3.4.5	Avaliação da produção de protease.....	46
3.4.6	Avaliação da produção de xilanase.....	46
3.4.7	Avaliação da produção de lipase.....	47
3.4.7.1	Teste de triagem de lipase por rodamina B.....	47
3.4.7.2	Teste de seleção primária de lipase.....	48
3.4.8	Cálculo dos índices enzimáticos.....	48
3.4.9	Testes de produção quantitativa de lipase.....	48
3.4.9.1	Quantificação de ácidos graxos por titrimetria.....	48
3.4.9.2	Determinação da atividade de lipase e protease por espectrofotometria.....	49
3.4.10	Análise estatística das atividades enzimáticas.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DAS AMOSTRAS DE SOLOS.....	52
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	55
4.2.1	Perfil fisiológico e bioquímico.....	55
4.2.2	Caracterização molecular.....	58
4.3	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE AMILASE, CELULASE, LIPASE, PROTEASE, PECTINASE E XILANASE.....	62
4.3.1	Avaliação da produção de amilase, celulase e protease em pH 5..	62
4.3.2	Avaliação da produção de pectinase em pH 7.....	64
4.3.3	Avaliação da produção de protease.....	66
4.3.4	Avaliação da produção de xilanase.....	67
4.3.5	Avaliação da produção de lipase.....	68
4.3.5.1	Teste de triagem de lipase por rodamina B.....	68
4.3.5.2	Teste de seleção primária de lipase.....	70

4.4	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE LIPASE POR LEVEDURAS DE SOLO.....	71
4.4.1	Quantificação de ácidos graxos por titrimetria.....	71
4.4.2	Determinação da atividade de lipase por espectrofotometria.....	72
4.5	PRODUÇÃO DE MULTIENZIMAS.....	75
5	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXOS.....	85

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mercado de enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização em reações específicas importantes para diversos setores industriais. Destacando-se o crescimento da utilização dos micro-organismos em processos biotecnológicos graças aos avanços principalmente da Biologia Molecular e Bioquímica. O emprego de novas técnicas tem possibilitado a otimização na extração de componentes presentes nas células microbianas, além da sua modificação para utilização em processos que necessitem de uma especificidade maior que a naturalmente obtida pelos micro-organismos. As leveduras entram nesse contexto porque embora menos pesquisadas que os fungos filamentosos têm sido cada vez mais empregadas na Biotecnologia. A busca por novas espécies microbianas nos ambientes naturais, que contemplem os mais variados tipos de vegetação e de solo, possibilita a obtenção de compostos específicos para reações até então não realizadas ou realizadas de forma pouco específicas.

A premissa de que o solo é grande depósito dos mais variados micro-organismos e que espécies de leveduras com potencial biotecnológico podem ser descobertas focam os estudos para a região amazônica. Tanto por ser uma área ainda pouco explorada, quanto pela riqueza na biodiversidade, o que a torna interessante para estudos nos mais variados setores, em especial a produção de enzimas. Roraima, que apresenta solos sob uma vegetação heterogênea, formando ambientes únicos na região amazônica, constitui ambiente propício para a elaboração de pesquisas mais aprofundadas e em maior escala. Os quais, além de possibilitar traçar um perfil mais detalhado do potencial enzimático dos micro-organismos da região, podem tornar relevante a participação da região amazônica no mercado de substâncias bioativas, que está voltado, quase que totalmente, para a região centro-sul do país.

O presente trabalho teve como principal objetivo aprofundar o conhecimento sobre as leveduras presentes, particularmente, nos solos do Parque Nacional do Viruá e no Campus Cauamé. A pesquisa utilizou a estrutura do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio/MCTI), que possibilitou a obtenção de dados de estudos padronizados referentes ao ambiente, tais como clima, solo, vegetação, etc.

A coleta e o processamento seguindo protocolos específicos, permitiu o isolamento, identificação das espécies com maior ocorrência e a capacidade das mesmas em produzir as enzimas hidrolíticas amilase, celulase, pectinase, protease e xilanase de interesse industrial, além do possível potencial multienzimático.

1.1 LEVEDURAS

As leveduras têm sido encontradas nos mais diversos ambientes: água, vegetação, ar, e solo. No solo, podem ocorrer em áreas descobertas ou cobertas por variados tipos de vegetação e sem restrições aos fatores físico-químicos presentes no mesmo. Para muitas leveduras, o solo é o único reservatório conhecido. *Lipomyces* e *Schwanniomyces* são gêneros de leveduras exclusivamente isoladas do solo. Os solos pobres podem acolher relativamente poucas leveduras, mas de solos ricos usados para agricultura pode ser possível quantificar cerca de 4×10^4 UFC/g. Em um gradiente de concentração estão em terceiro lugar como mais abundantes nesse substrato, perdendo para as bactérias e fungos filamentosos (VITAL; ZILLI, 2010; WALKER, 1998).

Alta fração da biota é grande responsável pela dinâmica do solo que vai desde atuação nos pontos chaves dos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes – nitrogênio, fósforo, enxofre e carbono – até na supressão de doenças vegetais e como fontes de enzimas, ácidos orgânicos e muitas substâncias ainda não exploradas. No estudo da biodiversidade microbiana do solo devem ser considerados fatores determinantes como clima, vegetação, qualidade e quantidade de matéria orgânica, pH, entre outros, sempre partindo de uma visão geral (macro-escala) até uma visão ao nível de habitat ou micro-escala (VITAL; ZILLI, 2010). Esses fatores são de suma importância para que haja uma melhor interpretação dos resultados e até adequações aos protocolos utilizados, sempre considerando a realidade ambiental desses micro-organismos. No Brasil a descrição dessas espécies ainda é muito pouca com possibilidade de novas descobertas tanto no que diz respeito à taxonomia, quanto ao isolamento de substâncias bioativas mais específicas e de grande interesse biotecnológico.

1.2 TAXONOMIA DE LEVEDURAS

A taxonomia convencional de identificação e caracterização de leveduras baseia-se em propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. As características morfológicas são as primeiras propriedades observadas, nelas são visualizados os caracteres macro-morfológicos, em nível colonial, como por exemplo: cor, textura, borda, forma e brilho; e os micro-morfológicos, em nível celular, como por exemplo: a forma celular, formação de pseudo-micélios e tipo de reprodução: assexuada por gemulação ou fissão, e sexuada pela formação de ascos, ascósporos, teliósporos, basídios, basidiósporos, etc. (LACHANCE et al., 2001; YARROW, 1998).

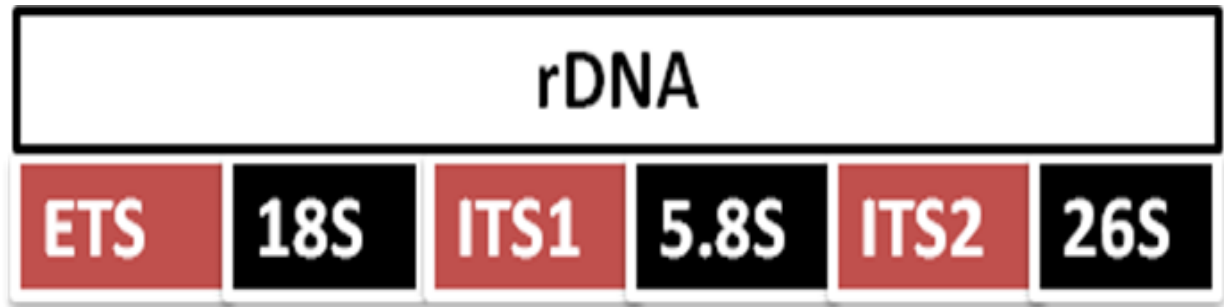
Nos testes fisiológicos são realizadas avaliações do crescimento dos isolados frente a diversos fatores, tais como: testes de assimilação de diversos compostos (fontes de carbono e energia), e testes fermentação de vários açúcares – tais como glucose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, etc. Testes de sensibilidade à cicloheximida, temperatura máxima de crescimento e osmotolerância também são realizados. Os testes bioquímicos mais utilizados para identificação de leveduras são o teste do DBB que verifica a reação das colônias com o corante azul de diazônio B, e a produção de urease (LACHANCE et al., 2001; YARROW, 1998).

Devido aos erros observados na utilização da taxonomia convencional, atualmente a taxonomia molecular está ganhando cada vez mais espaço. Pela identificação molecular das leveduras é possível realizar a caracterização genética, em nível ecológico e filogenético. Nos últimos anos, tem sido utilizado o DNA ribossômico por estar presente em todos os seres vivos e por possuir partes conservadas intercaladas por partes variáveis (FEEL, 1993; KURTZMAN; ROBNET, 1998; SCORZETTI et al., 2002).

Nas leveduras, o DNA ribossômico é composto pela região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5.8S, uma outra região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S (figura 1). Esse último tem sido utilizado para diferenciar quase todas as espécies por apresentar sequências menos conservadas que os demais genes do rDNA e assim usada para relacionar espécies e grupos taxonômicos relacionados. Quando não é possível a identificação apenas pelo sequenciamento dessa região, é realizado o sequenciamento das regiões ITS

em conjunto com 26S para a confirmação de novas espécies de leveduras (FEEL, 1993; KURTZMAN; ROBNET, 1998; SCORZETTI et al., 2002).

Figura 1 – Esquema da estrutura do DNA ribossômico demonstrando as regiões espaçadoras (ETS, ITS1 e ITS2) e os genes presentes (18S, 5.8S e 26S).



1.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são proteínas diferenciadas que participam das reações metabólicas dos seres vivos, catalisando a maioria das reações químicas dos sistemas biológicos. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Biologia Molecular e Bioquímica (NC-IUBMB), as enzimas são classificadas em seis classes principais de acordo com o tipo de reações que catalisam: hidrolases, oxirredutases, transferases, liases, isomerases e ligases. A nomenclatura de tais classes inicia-se pela abreviatura em inglês da Comissão de Enzimas (EC) do NC-IUBMB, seguida por até 4 dígitos, que vão de acordo com a classe e subclasses. Exemplo: as hidrolases são pertencentes a classe 3, e são codificadas como EC 3, as glicosilases são subclasse 2 das hidrolases, logo são codificadas EC 3.2 (MOSS, 2001).

As oxidorredutases (EC 1) catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução; as transferases (EC 2) catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.; as hidrolases (EC 3) catalisam reações de hidrólise de ligação covalente; as liases (EC 4) catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico; as isomerases (EC 5) catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos; e as ligases (EC 6) catalisam

reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas de energia (ATP), de acordo com Moss (2001).

As enzimas microbianas são empregadas nos mais variados setores industriais. Isso se deve a dificuldade em extrair esses compostos de tecidos animais e vegetais, principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas, além da farmacêutica. Sua produção em larga escala tem como objetivo suprir as necessidades do mercado que está em franca expansão nos últimos anos. Pela alta seletividade das enzimas, há a necessidade de pesquisas visando obter novas variedades, proporcionando mais alternativas para o mercado (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

A capacidade das leveduras produzirem uma ampla variedade de enzimas, tais como, proteases, caseinases, celulasas, lipases, celobiasas, xilanasas, esterases, entre outras, evidencia o seu grande potencial biotecnológico. Além de torná-las cada vez mais interessantes para estudos na utilização dos seus compostos, como, por exemplo, nas indústrias de papel, farmacêutica, alimentícia e atualmente cada vez mais utilizadas como mediadores de reações na produção de biodiesel.

1.3.1 Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 glicosídicas de polissacarídeos ou de seus produtos de degradação. No substrato amido hidrolisam liberando diversos produtos como dextrinas, maltose e glicose. Podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, que rompem as ligações no interior da cadeia (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glicoamilases, as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (GUPTA et al., 2003).

O amido é composto principalmente por polissacarídeos de amilopectina (80-85%), mas também por amilose (15-20%) que juntamente com a primeira assumem diferentes conformações e assim são encontrados em estado cristalino ou amorfo. É a principal molécula de armazenamento de carbono em plantas sendo a fonte de

energia mais utilizada pelos animais, incluindo seres humanos. É armazenado em diferentes órgãos e tecido vegetal, como em plastídeos de folhas, frutos e no endosperma de cereais em uma estrutura bastante complexa, formando grânulos com diâmetro que pode variar de 0,1 a 50 μm . A amilose e a amilopectina estão entre as que mais sofrem alterações ao longo do amadurecimento do fruto, promovidas por reações enzimáticas de síntese e degradação. Isto implica em importantes mudanças na fruta, como por exemplo, o amolecimento e adoçamento, relevantes para o seu consumo como alimento ou produto de comercialização (BALL; MORREL, 2003; BULÉON et al., 1998; MACRAE et al., 1992).

As amilases representam 25% do mercado de enzimas e encontram aplicações em todos os processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido. Durante muitas décadas a utilização das enzimas α -amilases tem sido predominante nas indústrias de amido, e um número de fontes microbianas existem para a produção eficiente desta enzima. Apesar disso, apenas algumas estirpes selecionadas de fungos e bactérias satisfazem os critérios para a produção comercial. A busca de novos micro-organismos que possam ser utilizados para a produção de amilase é um processo contínuo. Recentemente, estudos têm apresentado bons resultados no desenvolvimento de técnicas de purificação dessa enzima, permitindo assim o seu emprego em setores farmacêuticos e clínicos que requerem α -amilases de alta pureza (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

1.3.2 Celulases

As celulases (3.2.1) constituem um grupo complexo de enzimas hidrolases que quebram a celulose. A hidrólise completa da celulose requer a ação combinada de pelo menos três grupos de enzimas que atuam em sinergia: endoglucanases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam ligações glicosídicas no interior da cadeia, principalmente nas regiões amorfas, liberando fragmentos menores; celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91), que hidrolisam ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, liberando dímeros de glucose (celobioses) e, β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam as celobioses, liberando unidades de glucose. Além destas, outras proteínas como as expansinas e as swoleninas têm sido reportadas como capazes

de afrouxar a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005; CARVALHO et al., 2009).

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído unicamente por moléculas de glucose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), que resultam da perda de uma molécula de água. Em conjunto com a lignina e a hemicelulose compõe a parede celular vegetal. A proporção entre os componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina) depende da espécie vegetal e varia de camada para camada. Em geral, o teor de lignina encontrado em madeiras de coníferas (25-35%) é superior àquele encontrado em madeiras de folhosas (18-25%). Por outro lado, enquanto a lignina responde por até 84% do peso da lamela média composta (LM + P), a parede secundária interna (S3) é constituída por até 87% de hemicelulose, com pouca ou nenhuma lignina. A parede secundária média (S2), usualmente mais espessa que as demais, apresenta em média 54% de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

Um dos maiores entraves para a exploração comercial das celulasas é o elevado custo de produção, apesar do mercado de enzimas para celulasas ser bem promissor, onde as mesmas são usadas nas indústrias de papel, no tratamento de resíduos de polpa de celulose, para aumentar a extração de substâncias fermentáveis na produção de cerveja e nas indústrias de fermentação alcoólica. A alta produtividade, aliada com a redução do custo de produção incluindo aí a busca de novos micro-organismos produtores de enzimas mais específicas, torna o processo de fermentação no estado sólido uma tecnologia promissora para a produção de celulasas (JOO et al., 2009; KRISHNA, 1999).

1.3.3 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolases que catalisam a hidrólise total do triacilglicerol a glicerol e ácidos graxos livres; ou parcial, do triacilglicerol a diacilglicerol e monoacilglicerol, possuindo capacidade única em agir na interface

óleo-água. Assim, essas enzimas não obedecem às equações de Michaelis-Menten para cinética enzimática (velocidade das reações catalisadas pelas enzimas que possuem apenas um substrato), usada somente para reações catalíticas em fase homogênea. Tanto a atividade quanto a produção de lipase são influenciadas pelo tamanho da emulsão e sua estabilidade, sendo necessária uma interface óleo-água ampla e estável de gotículas lipídicas (CARVALHO et al., 2003; GONÇALVES; COLEN; TAKAHASHI, 2013).

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo e a atividade hidrolítica um dos processos mais utilizados para tais reações, destacando-se as lipases como as enzimas hidrolíticas mais utilizadas nos processos industriais que necessitam da quebra dessa macromolécula em subprodutos (COSGROVE; CHURCH; PRYOR, 1987).

As lipases mais utilizadas industrialmente são provenientes de micro-organismos, em função de certos fatores, como procedimentos mais simples de isolamento, onde são obtidas a partir de caldo fermentado, maior estabilidade e diversidade que as lipases provenientes de outras fontes, além da alta seletividade de substrato. Além disso, a maioria é produzida extracelularmente, favorecendo os processos de extração e purificação (CARVALHO et al., 2003).

Fariha-Hassan et al. (2010) trazem uma revisão sobre a aplicação das enzimas de origem microbiana na indústria de detergentes, destacando o emprego desde a utilização em detergentes domésticos até detergentes para lavagem de equipamentos hospitalares, tendo como principal benefício a diminuição da utilização de substâncias químicas nocivas ao meio ambiente. Nas aplicações industriais das lipases, apesar de sua utilização predominar nas indústrias de detergentes, há novas aplicações nos campos da indústria farmacêutica, química, alimentícia, petroquímica, entre outras (GANDHI, 1997).

Assim, há um grande interesse das indústrias por micro-organismos com maior produção e especificidade de lipases, tendo em vista o vasto campo de emprego de tais enzimas e a necessidade de reações cada vez mais refinadas na

dinâmica industrial, destacando a seletividade e estabilidade como fatores essenciais.

1.3.4 Pectinases

As pectinases podem ser classificadas sob vários critérios, mas em relação aos mecanismos de ação sobre o substrato, essas enzimas são classificadas em dois grupos: endopoligalacturonase, que promove a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato (endo-PG, E.C.3.2.1.15), e exopoligalacturonase, que hidrolisa a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora (exo-PG, E.C.3.2.1.67) da enzima (SAKAI et al., 1993).

A pectina ocorre principalmente na lamela média e nas paredes celulares de vegetais superiores associadas à celulose e à hemicelulose, contribuindo na firmeza e estrutura dos seus tecidos e pode ser conceituada como material polimérico solúvel em água no qual, aproximadamente 75% dos grupos carboxilas das unidades do ácido galacturônico estão esterificados com metanol. Assim como os ácidos pectínicos, a pectina também é capaz de formar géis com açúcar em meio ácido sob condições adequadas (ASSIS; MARTINS; OLIVEIRA, 2007; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

Genericamente, as pectinas com mais da metade dos grupos carboxila esterificados com metanol, são chamadas de pectinas com alto grau de metoxilação e com menos da metade, de pectinas com baixo grau de metoxilação, que pode também possuir grupos amida. A pectina pode ser usada em um grande número de alimentos como agente gelificante, espessante, texturizante, emulsificante e estabilizador (ASSIS; MARTINS; OLIVEIRA, 2007; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

As pectinases microbianas possuem grande potencial e têm grande importância na era biotecnológica atual, devido as suas variadas aplicações, como na extração e clarificação de sucos de frutas, extração de óleo vegetal, chá e fermentação de café, clareamento de papel, sendo um aditivo em ração animal, além da utilização em indústrias de bebidas alcoólicas e de alimentos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

1.3.5 Proteases

As proteases são constituintes essenciais em todas as formas de vida. Estão envolvidas em uma grande variedade de funções fisiológicas complexas como catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, arranjo de tecidos, morfogênese, ativação de precursores de enzimas e liberação de hormônios. Têm papel importante em processos patológicos inflamatórios, crescimento tumoral e metástase. A liberação de peptídeos precursores de proteínas e transporte de proteínas secretadas através das membranas também são eventos que requerem a participação de proteases. As enzimas proteolíticas são classificadas em variados grupos. Dependendo do pH ótimo de atividade elas são definidas como alcalinas, neutras ou ácidas; com base nas características do sítio ativo, em metaloproteases (EC 3.4.24), cisteínas ou sulfidril proteases (EC 3.4.22), aspartil-proteases (EC.3.4.23) ou serino-proteases (EC.3.4.21), segundo Rao et al. (1998).

As proteases de origem microbiana encontram ampla aplicação em importantes processos industriais, desde a fabricação de detergentes, passando pela produção de alimentos processados, processamento de couros, síntese de compostos farmacêuticos, até o tratamento de resíduos de diversos tipos de indústrias. A indústria de detergentes é a maior consumidora industrial de enzimas proteolíticas, as quais figuram como constituintes essenciais na formulação de seus produtos. A importância das leveduras como produtoras de enzimas proteolíticas de interesse industrial foi negligenciada por muito tempo, quando o foco principal das pesquisas neste campo recaía sobre *S. cerevisiae*, uma espécie que produz pouca ou nenhuma protease extracelular. Muitas leveduras, no entanto, produzem proteases extracelulares em quantidades significantes (BRIZZIO et al., 2007; RAY et al., 1992; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; ZARZOSO et al., 1998). Assim, o isolamento de novas leveduras com este potencial passou a ser um dos focos deste campo de pesquisa. Tanto pela busca de cepas com boa taxa de produção, quanto pela necessidade de se obter enzimas cada vez mais seletivas nos processos industriais, tendo em vista as várias classes existentes neste grupo enzimático e a utilização de substratos específicos nas reações.

1.3.6 Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são um dos componentes do sistema de enzimas necessário para degradar a hemicelulose. O mecanismo de indução de xilanase é um fenômeno complexo. Sua regulação em micro-organismos ocorre de forma quantitativa, através de expressão gênica. De acordo com Kulkarni; Shendye; Rao (1999), potentes indutores naturais não conseguem entrar nas células microbianas, sendo requeridos fragmentos de baixo peso molecular, como os xilooligossacarídeos, a xilobiose e a xilose, liberados pela ação de pequenas quantidades de xilanases produzidas constitutivamente. Após a fragmentação e liberação dos fragmentos, a xilosidase permease transporta esses fragmentos para dentro da célula que, por sua vez, induzem outros genes que codificam mais enzimas xilanase. Os xilooligossacarídeos e xilobiose são reduzidos a xilose pela ação da xilosidase intracelular. Ao haver níveis consideráveis de xilose na célula microbiana, estas reprimem a expressão de genes que codificam as xilanases.

A xilana é o principal componente hemicelulósico das plantas e, depois da celulose, é a mais abundante fonte de carbono na natureza (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Na parede celular de plantas interage com a celulose e a lignina, via interações covalentes e não covalentes formando uma interface entre lignina e celulose importante para coesão das fibras e manutenção da integridade da parede celular. É tipicamente localizada na parede celular secundária, mas pode ser encontrada na parede celular primária. Esse heteropolissacarídeo é formado por uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, e por grupos substituintes nas cadeias laterais, sendo mais usuais os resíduos de acetil, arabinosil e glucuronosil (BEG et al., 2001; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Nas aplicações industriais da xilanase, destaca-se a utilização no branqueamento da polpa de papel. O branqueamento convencional da polpa causa vários problemas nos efluentes, devido ao uso de compostos clorados. Além disso, um fator importante é a possibilidade do uso de xilanases com completa ausência da atividade de celulasas para preservar as fibras de celulose. Além do processamento da polpa de papel nas indústrias de celulose, há uma infinidade de outros setores

industriais que utilizam esse tipo de enzima. Associadas às celulases, as xilanases são aplicadas no processo de clarificação de sucos e vinhos. Também combinadas, essas enzimas podem ser usadas na fabricação de café solúvel; na otimização da extração a frio de óleos de sementes, no melhoramento do teor nutricional de alimento animal através da degradação parcial de silagens de grãos, entre outros usos (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

1.4 LEVEDURAS DE SOLO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Poucos estudos têm examinado especificamente a população microbiana do solo da região Amazônica, embora haja expectativa de excelentes resultados devido à riqueza da biodiversidade local (VITAL; ZILLI, 2010). Silva Neves, Porto e Teixeira (2006), em estudo para isolar leveduras de solo da região Amazônica, constataram que as espécies mais frequentes são *Candida aquatica* e *C. tropicalis*. Nas análises quantitativas e qualitativas a maioria das leveduras produziu protease, destacando-se *C. intermedia* que expressou maior atividade proteolítica, demonstrando a capacidade desses micro-organismos em produzir enzimas.

Algumas pesquisas com micro-organismos de solo já foram realizados em Roraima. Vital et al. (2002) avaliou a diversidade e o potencial micocinogênico de leveduras isoladas de solos na Ilha de Maracá-RR. Nesse estudo, diferentes fitofisionomias foram utilizadas como padrão para a amostragem, sendo isoladas 240 estirpes de leveduras, identificadas dentro de 16 gêneros e 71 espécies, com predominância dos gêneros: *Candida*, *Rhodotorula* e *Debaryomyces*. Cerca de 80% das leveduras tiveram afinidade ascomicéticas, e a maior diversidade de espécies foi encontrada nas amostras de solo cobertas por gramíneas. Outras leveduras foram determinadas como pertencentes a possíveis novas espécies ou novas variedades das mesmas. Os testes sobre a capacidade micocinogênica dos isolados de leveduras realizados na pesquisa demonstraram que seis linhagens produziram micocinas: *Issatchenkia* sp., *Saccharomyces exiguus*, *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens*, e três *W. saturnus* identificados conforme dados de taxonomia molecular.

Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa¹ avaliaram o perfil biotecnológico de leveduras de solo no Parque Nacional do Viruá-RR, e constataram que algumas leveduras das 556 linhagens isoladas apresentaram alto potencial de produção de uma variedade de enzimas extracelulares, biotecnologicamente interessantes como: amilases, celulases, esterases, lipases e proteases. Como resultados, algumas dessas cepas foram caracterizadas como ótimas candidatas a estudos mais detalhados, visando aplicação em processos de produção industrial.

1.5 RORAIMA E O PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE – PPBio

Roraima é um estado localizado na região Norte do país, com uma área territorial de 224.301,040 Km², dividido em 15 municípios e população em torno de 450.479 habitantes (IBGE, 2010), sendo Boa Vista a capital. A fitofisionomia do Estado de Roraima pode ser dividida em três grandes sistemas ecológicos: florestas, savanas ou cerrados. A vegetação tipo florestal que ocorre no estado é bastante diversificada, constituída pela floresta ombrófila densa e ombrófila aberta na porção ocidental e meridional. As áreas de savana se apresentam em forma de mosaico, onde ocorrem formações não florestais estas são denominadas por “lavrado”. As diferenças de vegetação têm relação direta com o clima, solo e relevo onde se desenvolvem (BARBOSA; XAUD; COSTA E SOUZA, 2005; IBGE, 2005). Essa diversidade de biomas faz de Roraima um excelente local para a pesquisa de micro-organismos presentes nos mais variados tipos de solos.

O Programa de Pesquisa em Biodiversidade – PPBio foi oficializado pela Portaria MCT nº 268, de 18.06.2004, em consonância com os princípios da Convenção sobre Diversidade Biológica e com as Diretrizes da Política Nacional de Biodiversidade (Decreto 4.339 de 22/08/2002). Tem como objetivo central: articular a competência regional e nacional para que o conhecimento da biodiversidade brasileira seja ampliado e disseminado de forma planejada e coordenada. Os

¹ Grupo de Pesquisa Substâncias Bioativas, líder professor Marcos Vital, trabalho em preparação.

objetivos específicos do Programa são: apoio à implantação e manutenção de redes de inventário da Biota; apoio à manutenção, ampliação e informatização de acervos biológicos do País (coleções *ex situ*); apoio à pesquisa e desenvolvimento em áreas temáticas da biodiversidade; desenvolvimento de ações estratégicas para políticas de pesquisa em biodiversidade (PPBio, 2005).

A unidade básica para levantamentos de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD) proposta dentro do PPBio e instalada em Roraima é um sistema de trilhas em forma de grade de 5 km x 5 km (figura 2) ou módulos (figura 3) sobre o qual parcelas permanentes são distribuídas sistematicamente, e que seguem a curva de nível. Para análises dentro do mesmo sítio, cada parcela ou módulo de amostragem adotado deve ser considerado uma réplica independente. Para comparações entre sítios, entende-se que o sistema de grade representa uma única parcela composta por muitas sub-parcelas.

Figura 2 – Grade do PPBio localizada no Parque Nacional do Viruá/RR destacando as 30 parcelas permanentes em branco.



Fonte: PPBio (2007).

O núcleo regional Roraima possui os seguintes sítios de pesquisa: Campo Experimental Água Boa, localizado na área de pesquisa da Embrapa Roraima, no município de Boa Vista; *Campus* Cauamé da UFRR, localizado em Boa Vista; Parque Nacional do Viruá, localizado no município de Caracaraí; e Estação Ecológica de Maracá, localizado no município do Amajari. Os dois primeiros possuem grades do tipo incompletas, denominados de módulos localizados em áreas exclusivamente de savana, e são os únicos do país que contemplam esse tipo de ambiente. Já os dois últimos possuem grades completas localizadas em áreas predominantemente compostas por florestas, com ambientes diversos em tipos de coberturas vegetais (PPBio, 2006).

Figura 3 – Módulo do PPBio localizada no Campus Cauamé/UFRR destacando as 19 parcelas permanentes em amarelo.



Fonte: PPBio (2006).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho foi baseado na capacidade das leveduras produzirem enzimas extracelulares e na sua diversidade em solos de diversos ambientes roraimenses, tendo os objetivos listados abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer a diversidade e a potencial produção de enzimas de interesse econômico por leveduras de solos roraimenses.

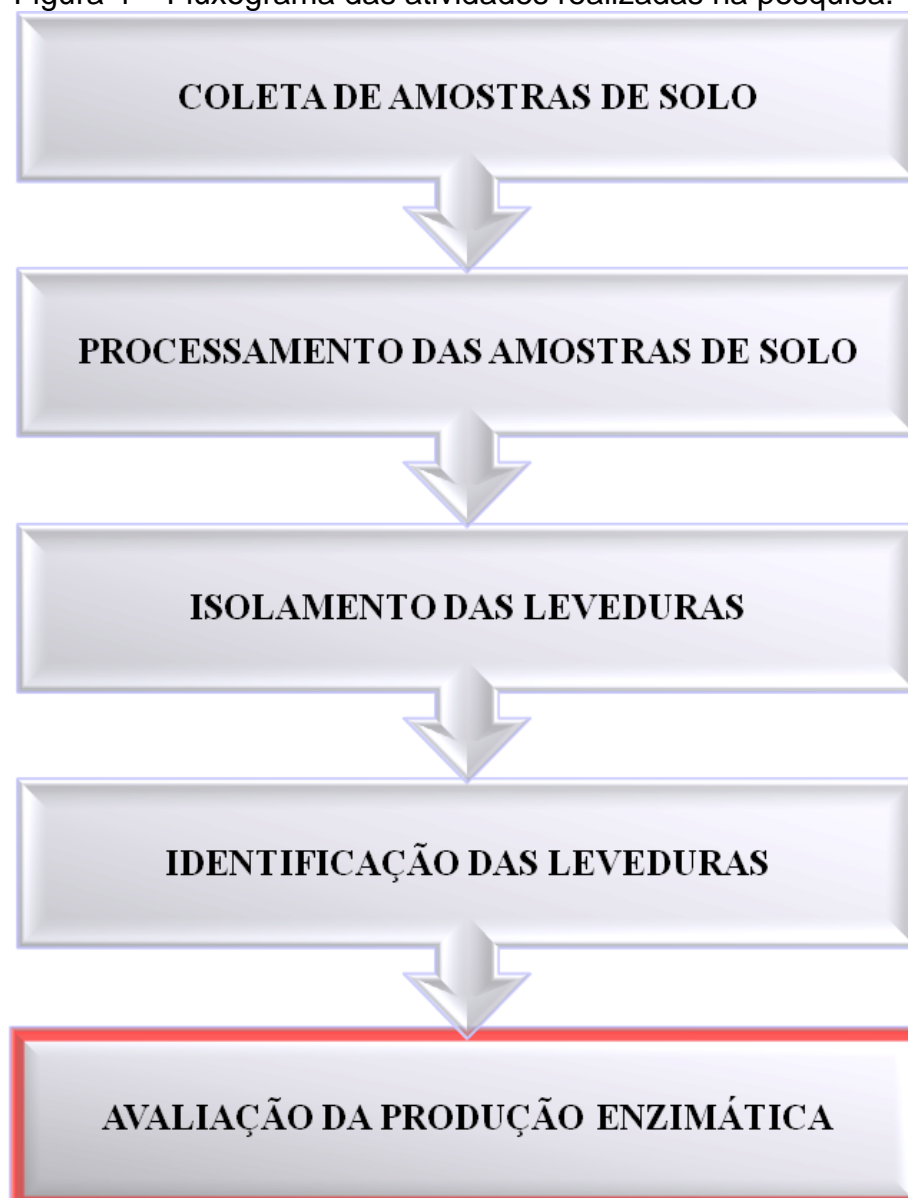
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de amostras de solos de floresta e de savana;
- Verificar a capacidade dos isolados em produzir amilase, celulase, lipase, pectinase, protease e xilanase.
- Identificar as leveduras produtoras das enzimas de interesse nesta pesquisa;
- Ampliar o número de isolados do laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) visando, inclusive, à disponibilização a Biotecnologia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse trabalho foram obtidas amostras de solo com base em um fluxograma pré-estabelecido ilustrado abaixo (figura 4). As Análises foram realizadas nos laboratórios do Centro de Estudos da Biodiversidade (Universidade Federal de Roraima), do Centro de Biotecnologia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), do Instituto de Ciências biológicas e da Faculdade de Farmácia (Universidade Federal de Minas Gerais).

Figura 4 – Fluxograma das atividades realizadas na pesquisa.



3.1 AMOSTRAGEM

Após selecionados os pontos de coleta, foram coletadas amostras de solo, das quais foram isoladas as leveduras a serem identificadas e testadas quanto a capacidade de produção extracelular de enzimas.

3.1.1 Área de estudo

A área de estudo compreende o Parque Nacional do Viruá e o Campus Cauamé da Universidade Federal de Roraima. Nestes locais o PPBio – Programa de Pesquisa em Biodiversidade dois sítios de estudo: uma grade completa (PARNA Viruá) e um módulo (Cauamé/UFRR).

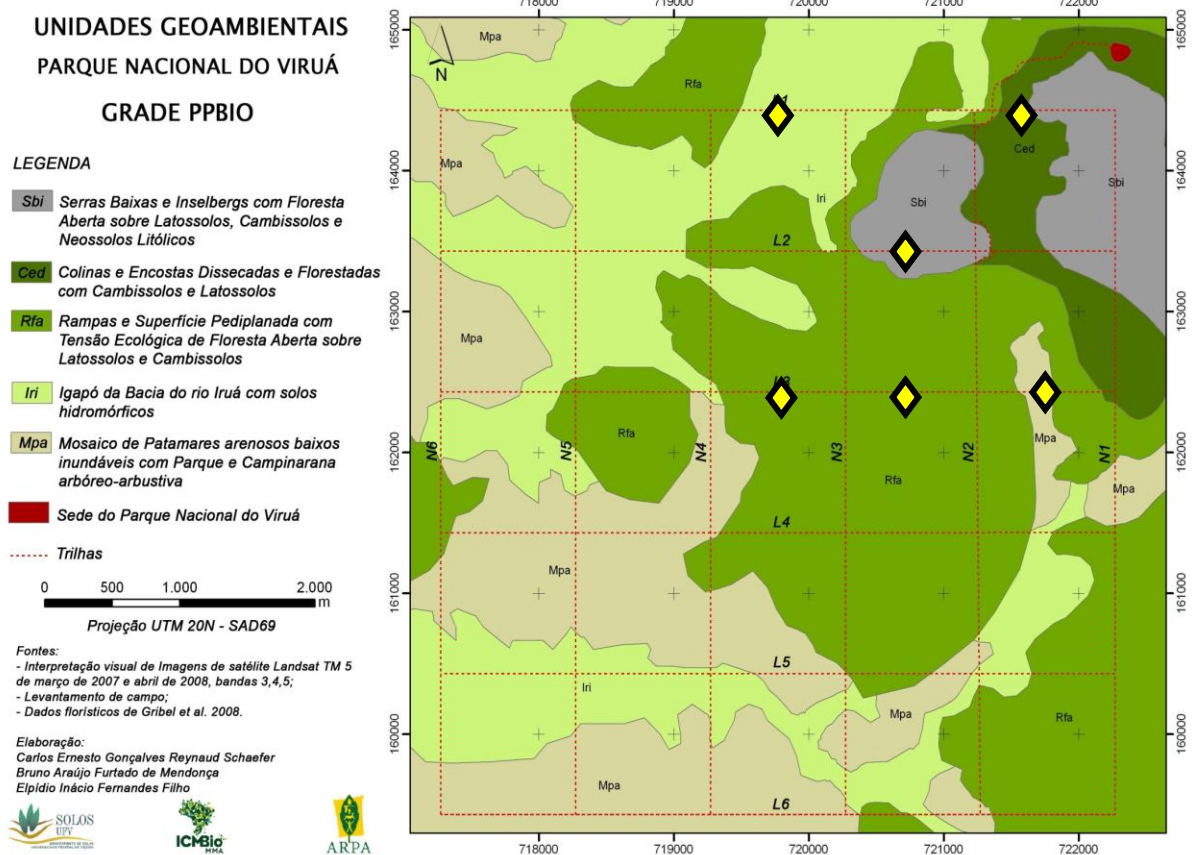
3.1.1.1 Parque Nacional do Viruá

O Parque Nacional do Viruá – PARNA Viruá – está localizado no município de Caracarái (RR). A grade do PPBio instalada nessa região é do tipo completa por possuir 30 parcelas permanentes em 227.000 hectares, possui uma vegetação de alta heterogeneidade ambiental, com presença de campos e cerrados, florestas densas e abertas, serras isoladas, com razoável diversidade e endemismo em sua flora sob um clima equatorial (quente e úmido), apresentando estação seca de pequena duração. A área é predominantemente plana o que favorece a formação de inúmeras lagoas, áreas encharcadas e inundáveis, com solos arenosos pobres quimicamente, ácidos e mal drenados, com pH variando de 3,0 a 5,0 (PPBio, 2010; PPBio, 2012).

A coleta das amostras de solos de regiões de floresta ocorreu no mês de abril de 2011 em seis parcelas da grade que foram selecionadas com base nas características de solo, relevo e vegetação (figura 5). O percurso da coleta correspondeu a mais de 20 km de caminhada, dividida em dois momentos. O índice pluviométrico na área do PARNA Viruá nesse mês foi em torno de 60-80 mm³, ou

seja, com chuvas moderadas nesse período que corresponde a coleta, segundo INMET (2011).

Figura 5 – Grade do PPBio localizada no Parque Nacional do Viruá/RR destacando os seis pontos de coleta em cinco ambientes diferentes (losângulos).



Fonte: ICMBIO (2009).

A figura 6 mostra os seis pontos selecionados com o código do tipo de ambiente, as características ambientais e coordenadas das parcelas de grade correspondentes. Foram contemplados cinco ambientes, e uma repetição do ambiente Rfa – correspondente Rampas e superfícies pediplana com tensão ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos – utilizando outra parcela para verificar se há diferença entre a população de leveduras em ambientes semelhantes. Na seleção dos pontos não foi utilizado apenas o critério tipo de solo devido a área possuir mais de um tipo em uma mesma parcela. Houve um estudo anterior classificando os solos presentes no PARNA Viruá, e embora a predominância seja de Espodossolos (PPBio, 2012), na área onde a Grade está

localizada predominam os Latossolos e os Cambissolos em quatro dos cinco tipos de ambientes.

Figura 6 – Pontos de coleta de amostras de solo na grade do PPBio do Parque Nacional do Viruá/RR.

	Código	Características	Parcela
Ponto 1	Ced	Colinas e encostas dissecadas e florestadas com Cambissolos e Latossolos.	L1N1
Ponto 2	Sbi	Serras baixas e inselbergs com floresta aberta sobre Latossolos, Cambissolos e Neossolos litólicos.	L2N2
Ponto 3	Iri	Igapó da bacia do rio Iruá com solos hidromórficos.	L1N3
Ponto 4	Mpa	Mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com Parque e campinarana arbóreo-arbustiva.	L3N1
Ponto 5	Rfa	Rampas e superfície ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos.	L3N2
Ponto 6	Rfa	Rampas e superfície ecológica de floresta aberta sobre Latossolos e Cambissolos.	L3N3

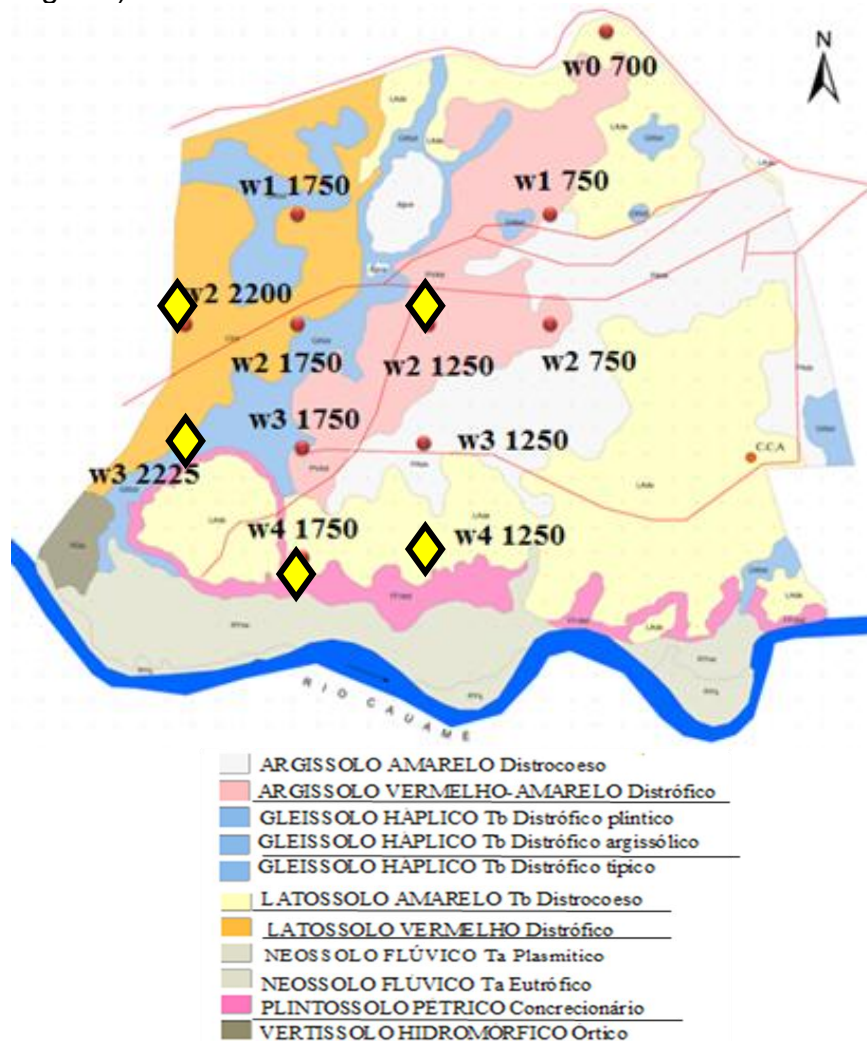
3.1.1.2 Campus Cauamé/UFRR

O Campus Cauamé da Universidade Federal de Roraima (UFRR) está localizado na região do Monte Cristo, na capital Boa Vista. O módulo do PPBio compreende uma área de 498 hectares, com 19 parcelas permanentes que possui uma predominância de savanas que variam entre savana parque e savana gramíneo-lenhosa, com alguns alinhamentos de veredas de buritizeiros e buritiranas (formações pioneiras). Ao longo do rio Cauamé há vegetação do tipo mata ciliar sob um tropical chuvoso (quente e úmido), apresentando nítido período seco (ICMBIO, 2009; PPBIO 2007).

Estudos pedológicos realizados por Benedetti et al. (2011) na bacia do rio Cauamé identificaram que os solos predominantes da região são: Latossolo Amarelo distrocoeso típico (LAdx), Argissolo Amarelo distrocoeso típico (PAdx), Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico latossólico (PVAd) e Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico (PVAd), Latossolo Vermelho distrófico (LVd), Neossolo Flúvico Ta eutrófico vertissólico (RYve), Gleissolo Háptico Tb distrófico argissólico (GXbd), Plintossolo Pétrico concrecionário (FFcb), Gleissolo Háptico Tb distrófico plíntico

(Gxbd), Neossolo Flúvico psamítico típico (Ryq), Vertissolo Hidromórfico órtico (VGo) e Gleissolo Háptico Tb distrófico típico (Gxbd). De modo geral, os solos apresentam baixos valores de pH, soma e saturação por bases e baixa atividade da fração argila, influenciados principalmente pela pobreza química e pela composição mineralógica do material de origem. Já os solos VGo e RYve, formados do material basáltico da Formação Apoteri ou dos sedimentos aluvionares transportados pelo rio Cauamé, mostram maior riqueza química e caráter eutrófico (figura 7).

Figura 7 – Módulo do PPBio localizada no Campus Cauamé/UFRR, destacando os cinco pontos de coleta em diferentes tipos de solo (losângulos).



Fonte: Benedetti (2007).

A coleta das amostras de solos em áreas de savana ocorreu no mês de novembro de 2011 em cinco parcelas da grade do PPBio Cauamé/RR (figura 7). O

percurso dentro da grade para realizar a coleta correspondeu a mais de 15 km. O índice pluviométrico na região do Campus Cauamé nesse mês foi em torno de 20-30 mm³, ou seja, período seco, segundo INMET (2011). Vale destacar que 2011 foi um ano atípico com um período chuvoso bem intenso e a região estudada sofreu grande acúmulo hídrico neste período.

Os tipos de solo coletados foram determinados de acordo com a presença na parcela, pois alguns não estavam dentro das trilhas, e foram esses: Argissolo vermelho-amarelo, Gleissolo haplico, Latossolo amarelo, Latossolo vermelho e Plintossolo pétrico. A figura 8 apresenta os tipos de solo de cada ponto e as coordenadas de cada parcela. Não houve repetição nesse caso por, diferentemente do PARNA Viruá, não serem ambientes e sim haver um único tipo de solo por ponto, sendo coberto apenas por vegetação de savana.

Figura 8 – Pontos de coleta de amostras de solo na grade do PPBio do Campus Cauamé/RR.

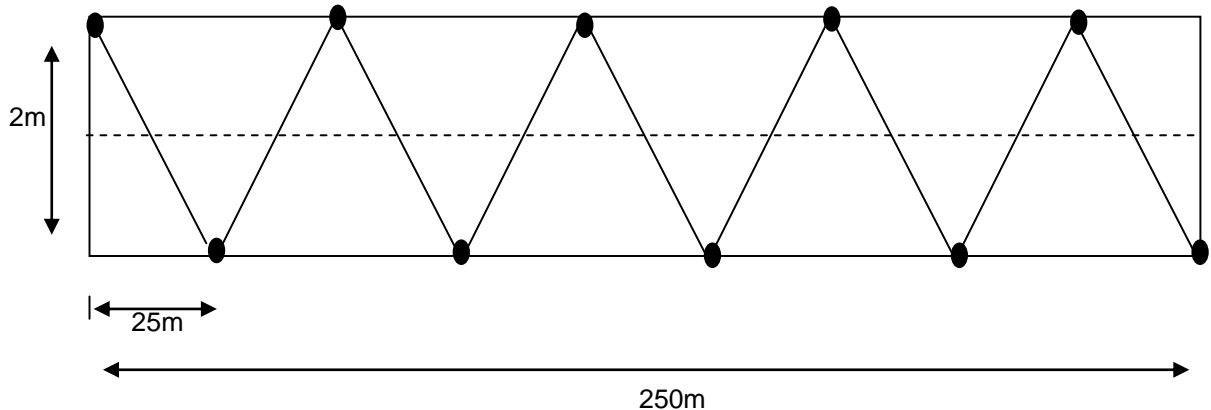
	Tipo de solo	Parcela
Ponto 1	Argissolo vermelho-amarelo distrófico	W2 1250
Ponto 2	Latossolo amarelo Tb distrófico	W4 1250
Ponto 3	Plintossolo pétrico	W4 1750
Ponto 4	Latossolo vermelho distrófico	W2 2200
Ponto 5	Gleissolo háplico	W3 2225

3.1.2 Coleta

A coleta seguiu o protocolo básico de coletas de amostras de solo para caracterização da diversidade microbiana (VITAL; ZILLI, 2009), o qual estabelece critérios amostrais de solo, dentro das grades do PPBio que possam ser utilizados para grupos microbianos contidos na matriz. Em cada parcela selecionada, correspondente a um ponto, foram coletadas 10 sub-amostras, com distâncias regulares de 25 m entre elas deslocando-se pela trilha demarcada, sempre alternando os pontos 1 m à direita e 1m à esquerda da mesma, em ziguezague (figura 9).

Com auxílio de um trado, cada sub-amostra foi coletada a uma profundidade de 10-15 cm, a fim de constituir uma amostra composta, sendo embaladas individualmente em sacos plásticos de primeiro uso. Em seguida foram identificadas com dados pertinentes tais como: código da parcela, número da sub-amostra, ambiente e data. Todas as sub-amostras foram armazenadas em ambiente protegido de dessecação e exposição solar e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos da Biodiversidade/UFRR, onde foram processadas em até 48 horas após a coleta.

Figura 9 – Esquema da amostragem de solo para isolamento de leveduras em parcelas do PPBio.



Fonte: Vital e Zilli (2009).

3.1.3 Processamento das amostras

Em laboratório, as sub-amostras de cada ponto foram misturadas, sendo retiradas folhas, raízes e invertebrados, formando uma amostra composta de solo, peneiradas em malha de 2 mm e homogeneizadas manualmente (figura 10), seguindo o descrito por Van Elsas e Smalla (1997).

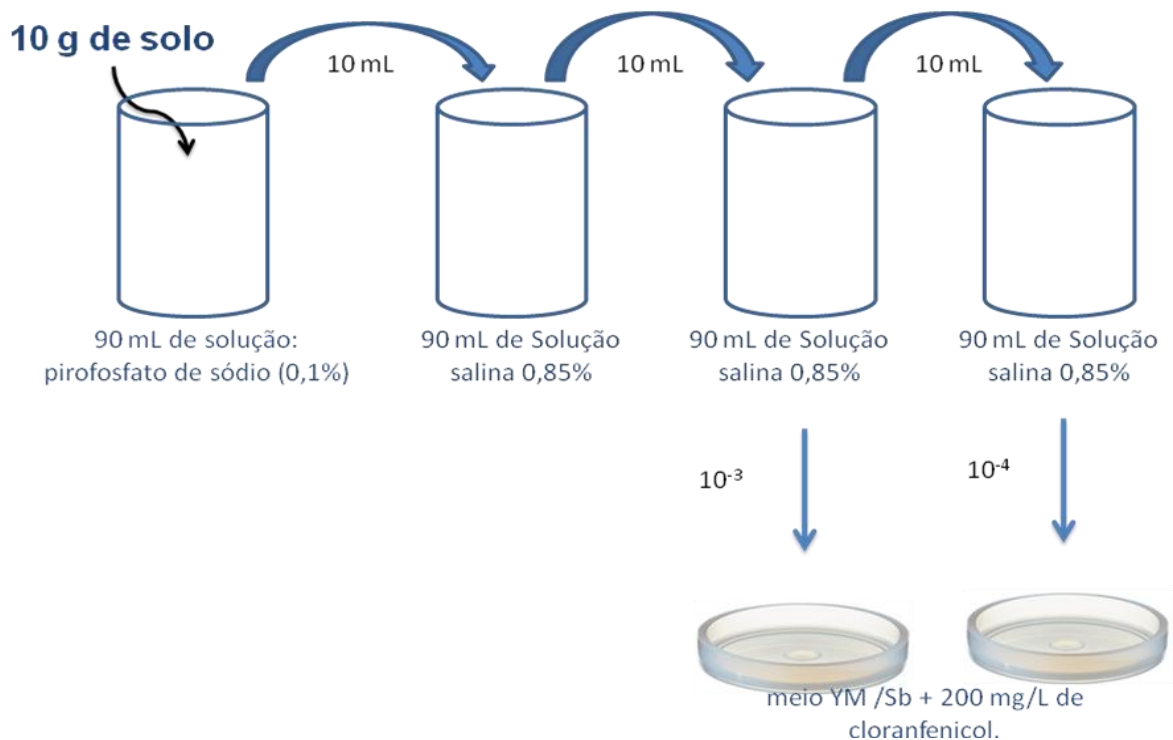
A partir da amostra composta foi realizada a diluição seriada: 10 g de solo foram adicionados em 90 mL de solução de pirofosfato de sódio (0,1%) com Twen 80 (0,1%), vigorosamente agitados por 30 segundos para que as partículas de solo se separassem e a solução ficasse homogênea. Desta suspensão resultante, 10 mL foram diluídos em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) até a concentração de 10^{-4} . Por fim, 1 mL das suspensões das concentrações 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas

utilizando pipetador semi automático, em triplicata, em dois meios: YM ágar (0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1,0% glicose, 2,0% ágar) e ágar Sabouraud (0,5% extrato de levedura, 1,0% peptona, 2,0% glicose, 2,0% ágar) com adição de 200 mg/L de cloranfenicol em ambos, e incubadas por 72 horas, respectivamente, a 23°C e 28°C (figura 11). Foram utilizados dois meios de cultura com a finalidade de maximizar o número de isolados.

Figura 10 – Homogeneização, peneiramento e diferentes amostras compostas de solo por ponto coletado.



Figura 11 – Esquema da obtenção de concentrações de inóculos para isolamento de leveduras de solo.



3.1.4 Isolamento e agrupamento das leveduras

Após incubação por 72 horas, as leveduras foram caracterizadas de acordo com as características macromorfológicas: cor (branca, creme, rosada, vermelha, etc), brilho (opaca ou brilhosa), forma (esférica, oval ou alongada), margem (regular, irregular ou em forma de raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, umbilicada ou convexa) e consistência (cremosa, dura, esfarelada, membranosa ou seca), pela observação direta das colônias nas placas com auxílio de um estereoscópio (lupa); e micromorfológica: presença de células eucarióticas pela observação em microscópio de lâminas a fresco contendo blocos de Agar-água (Agar 2%). As colônias de cada morfotipo foram contadas e as frequências anotadas por ponto.

Com o intuito de facilitar as identificações e testes enzimáticos, as leveduras foram agrupadas. Para isso, as características morfológicas dos isolados de cada ponto foram analisadas e após essa comparação o grupamento foi realizado, recebendo nessa etapa o código VR, representando “Viruá”, ou CA, representando “Cauamé”. As colônias representativas foram isoladas em culturas puras através da técnica de esgotamento em placas de Petri. Após a obtenção das colônias puras, estas foram armazenadas em triplicata, em tubos contendo YM ágar e ágar Sabouraud.

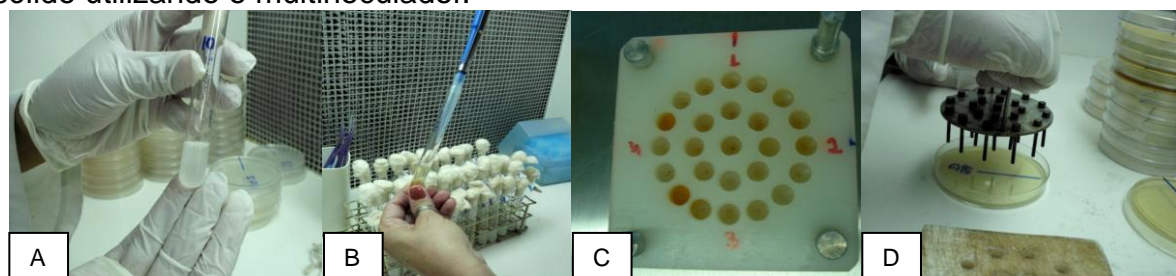
3.2 PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS LEVEDURAS

O perfil das leveduras foi determinado por meio de testes fisiológicos e bioquímicos, seguindo os padrões descritos por Yarrow (1998), aos quais se juntaram as características morfológicas já descritas no item 3.1.4. Esses testes fornecem um perfil dos isolados e foram de fundamental importância para a identificação dos mesmos.

3.2.1 Testes fisiológicos e bioquímicos

Nos testes fisiológicos e bioquímicos, foi obtido um perfil dos morfotipos através da realização de alguns testes de crescimento em diferentes temperaturas, tolerância e assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio utilizando, na maioria dos testes, a técnica da réplica-plate, onde até 21 isolados podem ser testados de uma só vez, através de um multinoculador (carimbo). Inicialmente, uma alçada de cada isolado foi suspensa em água destilada estéril e homogeneizada para a inoculação nos meios (figura 12). Nesse caso determinou-se como perfil por não terem sido realizados todos os testes necessários para entrar na chave de identificação de leveduras.

Figura 12 – Procedimentos realizados nos testes fisiológicos e bioquímicos para a caracterização de leveduras: A- suspensão de células em água destilada; B- inoculação em meios líquidos; C- base do multinoculador; e, D- inoculação em meio sólido utilizando o multinoculador.



Nos testes quanto ao crescimento em diferentes temperaturas, de cada morfotipo suspenso em água, foram inoculados 200 μ L em placas contendo ágar sabouraud (2,0% glicose, 1,0% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2,0% ágar) e incubadas nas temperaturas: 37, 40 e 42°C com leituras após 24 e 48 horas de incubação. Nos testes de fermentação, 200 μ L do inóculo suspenso foram inoculados em tubos contendo meio basal para fermentação – MBF (glicose 2,0%; peptona 0,75%; extrato de levedura 0,45%) e mantidos em temperatura ambiente, com leituras após 1, 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias de inoculação. Para verificar a assimilação e demais testes de tolerância, 100 μ L dos isolados foram pipetados nos poços do multinoculador e carimbados nas placas com meios específicos para cada

teste: fontes de nitrogênio, testes de tolerância, e assimilação a 39 açúcares diferentes. Todos os resultados foram anotados em fichas específicas.

Nos testes de tolerância foram utilizados os seguintes meios complexos: Meio 10% de NaCl (glicose 5,0%; NaCl 10%; peptona 1,0%; extrato de levedura 0,5%; ágar 2,0%); Meio cicloheximida (YNB 0,67%; ágar 2%; acrescido com 10 mL de glicose a 0,5% e 0,01% de cicloheximida); Meio produção de ácido/carbonato (glicose 5,0%; CaCO_3 0,5%; ágar 2,0%; extrato de levedura 0,5%); Meio sem aminoácido (Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos 0,67%; ágar 2%; acrescido com 10 mL de glicose 5,0%); Meio ácido acético (glicose 10%; peptona 1,0%; ágar 2,0%; extrato de levedura 1,0%; acrescido com 1% de ácido acético); Meio com 50% de glicose (glicose 50%; ágar 1,3%; extrato de levedura 0,1%).

Os meios utilizados para testar o crescimento dos morfotipos em diferentes fontes de carbono foram: Nitrito (ágar 2%; Yeast Carbon Base 1,17%; nitrito de sódio 0,026%); Nitrato (ágar 2%; YCB 1,17%; nitrato de potássio 0,078%); Lisina (ágar 2%; YCB 1,17%; lisina 0,076%); e como controle negativo destes testes foi utilizado YCB branco (ágar 2%; YCB 1,17%).

Nos testes para crescimento em diferentes temperaturas foi utilizado o meio Ágar Sabouraud (glicose 2,0%; peptona 1,0%; extrato de levedura 0,5%; ágar 2,0%). E nos testes de fermentação foi utilizado o meio basal de fermentação/MBF (glicose 2,0%; peptona 0,75%; extrato de levedura 0,45%) em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos. Como controle negativo placas e tubos ausentes de inóculos foram incubados paralelamente.

Nos testes de assimilação de açúcares e fontes de carbono foi utilizado o meio base (ágar 2,0%; YNB 0,67%) para acrescentar cada um dos 39 açúcares/fontes de carbono: Glicose, Galactose, L-sorbose, Maltose, Sacarose, celobiose, Trealose, Lactose, Melibiose, Rafinose, Melizitose; Inulina; Amido solúvel; D-xilose L-arabinose; D-arabinose; D-ribose; L-raminose; Etanol; Glicerol; Eritritol; Ribitol (adonitol); Galactitol ou dulcitol; D-manitol; D-glucitol ou sorbitol; Salicina; DL-Lactato; Succinato; Citrato de sódio; M-inositol; Metanol; Hexadecano; Glucosamina; Xilitol; Acetona; Etilacetato; Isopropanol; Gluconato; N-acetilglucosamina. Como controle negativo foi utilizado YNB branco (ágar 2,0%; YNB 0,67%).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação molecular das leveduras foram seguidos protocolos adaptados pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3.1 Extração do DNA Total

Para a extração do DNA genômico das leveduras, uma alçada de cada cultura foi ressuspensa em 100 μ L de tampão de lise (cloreto de sódio – NaCl 1M; solução de Tris-HCl pH 8,0 1M; ácido etilenodiaminotetracético – EDTA 0,5M pH 8,0; e, dodecilsulfato de sódio - SDS 10%). Após a ressuspensão, as amostras foram incubadas a 65 °C por 30 minutos. Cada ingrediente do tampão de lise possui funções específicas no processo de extração do material genético da levedura: o NaCl aumenta a quantidade de solutos fora da célula, aumentando assim a força iônica que contribui no rompimento celular; a solução Tris-HCl é o tampão mais utilizado para o tamponamento em pH 8,0, pH este que impede a ação das nucleases que degradam o DNA; o EDTA é um agente quelante que ajuda a reduzir o nível de protease ou da atividade de DNase, pois se liga aos íons de metal com uma carga +2, tais como o magnésio e o cálcio, tornando-os indisponíveis para reações das enzimas já citadas; e por fim, o SDS é usado como detergente para dissolver a membrana celular para que o conteúdo celular possa sair, em especial o material genético.

Para recuperação do DNA foi acrescentado 200 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v/v) e homogeneizado levemente por inversão, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 14.800 rotações por minuto (rpm). O reagente clorofórmio-álcool isoamílico associado à centrifugação promove a separação dos componentes em duas fases: os lipídios, proteínas e polissacarídeos ficam na fase orgânica (inferior), enquanto o DNA permanece na fase aquosa (superior).

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo, adicionado isopropanol (v/v), - que desidratam a molécula de DNA formando um sedimento visível na fase líquida do tubo – e homogeneizado levemente por inversão. O DNA

foi precipitado por 15 minutos e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão, adicionou-se 200 µL de etanol 70% – que separa o DNA do RNA, e o precipita – e centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o material resultante foi seco em estufa a 37°C por 30 minutos ou overnight (8-14 horas). Por fim, foi adicionado 50 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) para hidratar o DNA e, utilizou-se um espectrofotômetro (Termo scientific) com programa Nanodrop-1000 V3.7.1 para quantificação das amostras.

3.3.2 Amplificação utilizando o iniciador EI1

Os grupos de leveduras formadas com base em critérios morfológicos foram submetidos à técnica de PCR *fingerprinting* para agrupamento por perfil de bandamento utilizando o iniciador EI1, descrita por de Barros Lopes et al. (1996). Esta técnica tem a potencialidade de diferenciar espécies (variabilidade interespecífica) ou linhagens de uma mesma espécie (variabilidade intraespecífica) com o objetivo de melhorar a sensibilidade e diminuir os custos da identificação de leveduras (sequenciamento). A reação de PCR foi conduzida num volume total de 22 µL, contendo H₂O milli-Q estéril, 13,3 µL de Tampão, 2,5 µL de MgCl₂, 1,5 µL de iniciador EI1, 2,0 µL de dNTP, 1,0 µL de betaína 5M (opcional, facilita a atuação da DNA polimerase em regiões ricas em pareamentos CG), 1,0 µL de DMSO (opcional, facilita a separação de regiões ricas em CG e dificulta a formação de estruturas secundárias do DNA), e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (Foneutra). As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 3 minutos e, em seguida, submetidas a 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos, e extensão a 74°C por 1,3 minutos; por fim, um ciclo para extensão final a 74°C por 5 minutos.

As amostras foram inicialmente coradas com solução de GelRed e tampão de corrida 6x (v/v). O produto de amplificação foi visualizado após eletroforese a 100 V por cerca de 1 hora em gel de agarose 1,5% solubilizado em TBE 0,5X através de transluminador de UV, e fotografado com câmera polaróide. Em seguida, através da fotografia os perfis de bandas semelhantes foram agrupados por visualização a olho

nu, dentre estas, a que teve melhor concentração de DNA na etapa de quantificação foi utilizada nas demais etapas necessárias ao sequenciamento: amplificação dos domínios D1/D2 e da região ITS1-5.8S-ITS2.

3.3.3 Amplificação dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do rDNA

Para amplificação dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do DNAr foram utilizados os conjuntos de iniciadores NL1 e NL4, com protocolos padronizados por O'Donnel, 1993 e Rosa et al., 1999. A reação de PCR foi conduzida num volume total de 50 μL , contendo 5,0 μL de Tampão 10X, 1,5 μL de MgCl_2 , 1,0 μL de iniciador 1 (NL1), 1,0 μL de iniciador 2 (NL4), 2,0 μL de dNTP, 2,0 μL de betaína, 1,0 μL de DMSO, 0,2 μL de Taq DNA polimerase (Foneutra), 35,3 μL de H_2O milli-Q estéril e 1,0 μL de DNA.

As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C por 2 minutos e, em seguida, submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos, e extensão a 72°C por 20 segundos; seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto de amplificação com cerca de 500-600 pares de bases foi visualizado após eletroforese a 100 V, por cerca de 30 minutos em gel de agarose (1,0%) solubilizado em TBE 0,5X.

Anterior ao processo de corrida, as amostras foram coradas com solução de GelRed e tampão de corrida 6x (v/v). O gel foi visualizado em transluminador de UV. Após isso, o produto do PCR foi purificado. Primeiramente, foi preparado um MIX contendo 45 μL do produto PCR, 11,25 μL de EDTA 125 mM e 135 μL de etanol absoluto. Após a preparação do MIX o DNA foi deixado para precipitar por 15 minutos, centrifugado a 13.000 rpm por 25 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e, 120 μL de etanol 70% foram adicionados para lavar o sedimento. Após homogeneização por inversão foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, o etanol resultante foi deixado evaporar por 20 minutos a 37°C; e por fim, o DNA foi ressuspenso em 10 μL de água ultrapura. As amostras foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro (Termo Scientific) com programa Nanodrop-1000 V3.7.1.

Anteriormente ao sequenciamento foi necessária uma etapa de purificação dos amplicons obtidos em que 45 μL do amplicon foram adicionados a cada tubo de PCR contendo 11,25 μL de EDTA 125 mM e 135 μL de etanol absoluto; após homogeneização por inversão foram deixados em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, para que ocorresse a precipitação do DNA; em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm (rotação máxima) por 25 minutos, e o sobrenadante descartado por inversão. Foram adicionados 120 μL de etanol 70% para a lavagem do DNA, homogeneizados por inversão, e centrifugados a 14.000 rpm (rotação máxima) por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram então descartados por inversão e os tubos mantidos abertos à temperatura ambiente por *overnight*, para total evaporação do etanol. Por fim, as amostras foram re-suspensas em 10 μL de água ultrapura esterilizada, dosadas (NanoDrop) e estocadas a -20°C até o momento do sequenciamento. As amostras foram então enviadas para sequenciamento em parceria com a UFMG.

3.3.4 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1/ITS4

Para a confirmação do sequenciamento dos isolados identificados como possíveis espécies novas foi realizada a amplificação e sequenciamento das regiões intergênicas utilizando os iniciadores ITS1/ITS4. A reação de PCR foi conduzida num volume total de 50 μL , contendo 5,0 μL de tampão 10X, 3,0 μL de MgCl_2 , 1,0 μL de iniciador (ITS1), 1,0 μL de iniciador (ITS4), 1,0 μL de dNTP, 2,0 μL de betaína, 1,0 μL de DMSO, 0,2 μL de Taq (Foneutra), 34,8 μL de H_2O milli-Q estéril e 1,0 μL de DNA.

As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C por 2 minutos e, em seguida, submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos, e de extensão a 72°C por 20 segundos; seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Anteriormente ao sequenciamento foi necessária uma etapa de purificação dos amplicons conforme procedimento descrito no item 3.3.3. Por fim, foram enviados para sequenciamento em parceria com a UFMG.

3.3.5 Análise das sequências

Após o recebimento dos resultados do sequenciamento foram obtidas as sequências consensos (ou sequências contigs) entre as sequências *forward* (NL1 e ITS1) e *reverse* (NL4 e ITS4) amplificadas. Para a obtenção das sequências contigs foi utilizado o *software* DNA Baser Sequence Assembler (disponível em <http://www.dnabaser.com/>) juntamente com o programa Electropherogram Quality Analysis, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (disponível no site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), que confirma a qualidade do sequenciamento.

Ao final da edição e obtenção das sequências contigs estas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para isso foi necessário utilizar o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no portal NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esse processo permitiu identificar a similaridade, em porcentagem, da sequência contig com as sequências conhecidas e descritas na literatura.

3.4 PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE ENZIMAS

Os isolados foram testados quanto a produção extracelular das enzimas amilase, celulase, lipase, pectinase em pH 5 e em pH 7, protease e xilanase. Nos testes qualitativos as cepas que apresentaram halo em torno da colônia tiveram sua atividade avaliada pelo índice enzimático (ie), dado pela relação entre diâmetro médio do halo de degradação do substrato pelo diâmetro médio da colônia (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Já nos testes quantitativos as atividades foram avaliadas por meio de cálculos específicos para cada teste que forneceram o valor de U (unidades enzimáticas) das reações analisadas. Todas as atividades foram avaliadas em triplicata.

3.4.1 Avaliação da produção de amilase

Na avaliação das leveduras quanto a produção de amilase foi utilizado o amido como substrato da reação. Após o cultivo de células metabolicamente ativas (células jovens), estas foram suspensas em água destilada estéril; 50 µL foram inoculados em placas contendo o meio ágar amido (0,67% de YNB; 0,2% de amido solúvel; 1,5% de ágar; pH 6,0), em triplicata, identificadas e incubadas a 25°C por 7 dias.

A leitura foi realizada pela visualização da presença (+) ou não (-) de halo transparente, indicador da degradação do substrato, revelado com lugol. Após revelar, o reagente degrada toda a cultura deixando o local transparente e o restante da placa na cor roxa, por isso foi necessário delimitar a colônia antes da revelação.

3.4.2 Avaliação da produção de celulase

Na avaliação das leveduras quanto a produção de celulase foi utilizada a carboximetilcelulose como substrato da reação. Células jovens das leveduras foram suspensas em água destilada estéril e, em triplicata, 50 µL foi inoculado em placas contendo o meio ágar celulose (0,67% de YNB; 1,0% de carboximetilcelulose; 0,05% de celobiose; 1,0% de ágar; pH 6,0), identificadas e incubadas a 25°C por 7 dias.

A leitura foi realizada pela visualização da presença (+) ou não (-) de halo amarelado, indicador da degradação do substrato, revelado com vermelho congo (0,03%) e lavado com NaCl 1M. Durante a revelação, o reagente degrada toda a cultura deixando o local transparente e o restante da placa na cor vermelha, por isso foi necessário delimitar a colônia antes da revelação.

3.4.3 Avaliação da produção de pectinase em pH 5

Na avaliação das leveduras quanto a produção de pectinase em pH 5 foi utilizada a pectina como substrato da reação. Após o cultivo de células jovens estas

foram suspensas em água destilada estéril e, em triplicata, 50 µL foram inoculados em placas contendo o meio ágar pectina (0,67% de YNB; 1,0% de pectina; 2,0% de ágar; pH 5,0), identificadas e incubadas a 25°C por 7 dias.

A leitura foi realizada através da visualização da presença (+) ou não (-) de halo transparente, indicador da degradação do substrato, revelado com hexadecyltrimetilâmonio brometo 1,0%. Após revelar, o reagente degrada toda a cultura e o restante da placa fica turva, por isso foi necessário delimitar a colônia antes de revelar.

3.4.4 Avaliação da produção de pectinase em pH 7

Foi utilizado o mesmo meio, ajustado ao pH 7, condições de cultivo e revelação descritos no item 3.4.3.

3.4.5 Avaliação da produção de protease

Na avaliação das leveduras quanto a produção de protease foi utilizada a caseína como substrato da reação. Após o cultivo de células jovens estas foram suspensas em água destilada estéril e, em triplicata, 50 µL foi inoculado em placas contendo meio caseína (0,67% de YNB; 0,5% de caseína; 0,5% de glicose; 2% de ágar; pH 7,0), identificadas e incubadas a 25°C por 7 dias.

A leitura foi realizada através da observação direta da presença (+) ou não (-) de halo transparente e nítido, indicador da degradação do substrato, sem necessidade de emprego de reagentes para revelação da degradação enzimática no meio.

3.4.6 Avaliação da produção de xilanase

Na avaliação das leveduras quanto a produção de xilanase foi utilizada a xilana como substrato da reação. Após o cultivo de células jovens estas foram

suspensas em água destilada estéril e, em triplicata, 50 µL foram inoculados em placas contendo meio xilana (0,67% de YNB; 1% de xilana; 2% de ágar; pH 5,0) , identificadas com pincel permanente e incubadas a 25°C por 7 dias.

A leitura foi realizada através da visualização da presença (+) ou não (-) de halo transparente ao redor da colônia, indicador da degradação do substrato, que atesta a produção positiva da enzima pelas leveduras.

3.4.7 Avaliação da produção de lipase

Na avaliação qualitativa da produção de lipase foram empregadas duas técnicas: Testes de triagem de lipase por rodamina B e Teste de seleção primária de lipase. Em ambos os testes foi utilizada uma placa sem inóculo como controle negativo e uma cepa de *Yarrowia lipolytica* como controle positivo.

3.4.7.1 Teste de triagem de lipase por rodamina B

A técnica para triagem de leveduras por rodamina B seguiu o protocolo de Maciel, Pacheco e Gonçalves (2010) com algumas modificações na diluição do corante. As leveduras foram inoculadas em placas com meio sólido contendo ágar-água (1,5%) autoclavado a 120°C por 15 minutos e suplementado com 2% de óleo de oliva (esterilizado por calor seco a 180°C por duas horas) e 2% de corante rodamina B (esterilizado por filtração com filtro de 0,22 de µm) diluído a 0,07% e incubadas a 28°C por 4 dias.

A atividade lipolítica realizada foi evidenciada pela formação de um halo alaranjado fosforescente ao redor das colônias, quando estas foram irradiadas com luz UV 306 nm ou pela formação de uma zona similar embaixo da colônia, verso da placa evidenciando a ligação de ácidos graxos com o corante e assim uma possível atividade lipásica.

3.4.7.2 Teste de seleção primária de lipase

Os testes para a seleção primária ou qualitativa de lipase foram baseados na produção ou não de lipase em meio ágar lipase. As leveduras foram inoculadas em ágar lipase (0,5% de extrato de levedura; 2,0% de sais biliares; 2,0% de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$; 5,0% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0% de NaCl; 10% de óleo de oliva; 20% de ágar bacteriológico; pH 7,0) e incubados a 30°C por 48 horas. A presença de halo transparente em torno da colônia evidenciou a degradação lipolítica.

3.4.8 Cálculo dos índices enzimáticos (i.e.)

Para a determinação do índice enzimático das produções enzimáticas das leveduras testadas foi empregada a fórmula: $ie = dh/dc$. Onde ie, que representa o índice enzimático, é a relação entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Um ie igual a zero significa ausência de produção enzimática; um ie superior a zero e inferior a 1,0 significa baixa produção; e um ie maior que 1,0 representa boa produção enzimática.

3.4.9 Testes de produção quantitativa de lipase

Na avaliação quantitativa da produção de lipase foram empregadas duas técnicas: quantificação de ácidos graxos por titrimetria e determinação da atividade de lipase por espectrofotometria.

3.4.9.1 Quantificação de ácidos graxos por titrimetria

Essa técnica visa determinar de forma quantitativa a produção lipolítica. As leveduras foram testadas quanto a quantificação de ácidos graxos quebrados por inóculos padronizados, o que confirmam sua maior ou menor atividade, de acordo com o protocolo de Colen, Junqueira e Santos (2006).

No teste quantitativo as leveduras positivas da etapa anterior foram inoculadas em meio lipase (25,0% de peptona de carne; 25,0% de peptona de caseína; 1,0% de extrato de levedura; 1,0% de NaNO₃; 0,5% de MgSO₄.7H₂O; 1,0% de KH₂PO₄; 5,0% de óleo de oliva; pH 6,0) e incubadas em mesa agitadora orbital (shaker) em temperatura ambiente por 48 h. Em seguida, ocorreu a reação enzimática para quantificar a atividade, para isso foi utilizada uma emulsão contendo óleo polivinílico e óleo de oliva. Após a reação, as enzimas foram desnaturadas e os ácidos graxos quebrados foram quantificados por titulação, utilizando o corante fenolftaleína e NaOH. Para calcular a atividade enzimática foi utilizada a fórmula abaixo:

$$U = (\Delta V \times f_c \times 100) / t$$

Onde:

U é a unidade de atividade enzimática;

ΔV é a diferença entre a média das réplicas e o branco;

F_c é o fator de correção do NaOH utilizado;

100 é a quantidade de mols por mL da solução de NaOH utilizada;

t é o tempo da reação em minutos.

3.4.9.2 Determinação da atividade de lipase por espectrofotometria

Na determinação da atividade de lipase por espectrofotometria foram utilizados protocolos descritos no trabalho de Bussamara et al. (2010). Inicialmente foram preparadas as soluções necessárias para as reações: tampão citrato-fosfato (solução de ácido cítrico 2,10% (0,1M); solução fosfato de sódio dibásico 2,84% (0,2M)); solução I ou *p*-nitrofenolpalmitato (3 mg de *p*-nitrofenilpalmitato; 1 mL de isopropanol); e solução II (0,5 g de goma arábica, 2 g triton x100 e 450 mL de tampão citrato-fosfato). Para verificar se a solução II está homogênea foi realizada a curva padrão onde a solução II foi diluída, em triplicata, em *p*-nitrofenolpalmitato (100 μ L :900 μ L a 900 μ L :1 00 μ L), e tendo como branco 1000 μ L de solução II. As absorbâncias foram lidas e anotadas em planilha para um criar gráfico de dispersão

e assim obter o valor de R^2 (deve estar abaixo de 1) e que foi posteriormente utilizado na fórmula para obtenção do valor de unidades enzimáticas da reação (U).

Para o pré-inóculo da extração da lipase as leveduras com células metabolicamente ativas foram inoculadas em 20 mL de caldo GYMP (glicose 2%; extrato de levedura 0,5%; extrato de malte 2%; fosfato de sódio 0,2%) até atingir uma absorbância de 0,8 e incubadas em shaker em 200 rpm a 28°C por 18 h. Em seguida, 10% dos pré-inóculos foram transferidos para outros Erlenmeyers contendo 2% de óleo de oliva e 88% de meio pobre (glicose 0,2%, fosfato de potássio 0,1%, peptona 0,5% e sulfato de magnésio 0,01%), e incubados em shaker a 200 RPM a 28°C por 48h, sendo retirada uma alíquota após 24 h, e outra após 48 h.

Cada alíquota foi centrifugada a 9000 RPM por 10 minutos para retirar o sobrenadante livre de células. Para a determinação da atividade de lipase foi utilizado o substrato *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP). 0,9 mL do sobrenadante dos cultivos foi misturado a 0,1 mL de substrato (1 mL solução I diluído em 9 mL de solução II). Como controle negativo (branco) foi utilizado 0,9 mL do tampão citrato-fosfato misturado a 0,1 mL de substrato. Como controles positivos foram utilizados os sobrenadantes de *Yarrowia lipolytica* e de *Pseudozyma rubiensis*. Após 45 min de incubação a 37°C foi realizada a leitura da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro, zerando o aparelho com água destilada e utilizando o branco para descontar posteriormente nos valores de absorbância das amostras (ANEXO 1).

Para o cálculo da atividade da lipase foi utilizada a fórmula abaixo que dá as unidades de lipase (U) em mL de amostra por minutos. Essa fórmula é definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de *p*-nitrofenilpalmitato por minuto nas condições descritas acima.

$$U = [(m\u00e9dia da OD da amostra/y do gr\u00e1fico da curva padr\u00e3o) \times \text{quantidade testada em 1 mL/tempo de incub\u00e7\u00e3o}] \times \text{dilui\u00e7\u00e3o da amostra.}$$

Para a obtenção do valor da unidade enzimática, divide-se a absorbância pelo fator da curva padrão. Para expressar em µmol, multiplica-se pela quantidade testada (1 mL) e depois divide-se por 30, pois o ensaio é realizado em 30 minutos, e multiplica-se por 10 para mL, pois o ensaio foi realizado com 100 µL de amostra.

Associado ao teste de atividade de determinação de lipase foi realizada a determinação da atividade de protease com a finalidade de verificar se a produção enzimática de lipase por essa técnica não pode sofrer interferência por proteases produzidas em excesso durante a reação. Previamente foi preparado o tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,9 (93,2% de Na_2HPO_4 1M e 6,8% de NaH_2PO_4 1M). Para determinação da atividade de proteases foi utilizado o substrato azocaseína. Para cada amostra foi utilizado 0,2 mL de tampão, 0,1 mL de azocaseína (2%) e 0,1 mL do sobrenadante do meio pobre (utilizado no item 4.4.9). Após incubação a 50°C por 15 min, 0,8 mL de ácido tricloroacético 20% (TCA) foi adicionado para encerrar a reação. Nos brancos, um para cada amostra, o TCA foi adicionado antes da incubação. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5min e lidos a 400nm em espectrofotômetro; para zerar o aparelho foi utilizado o branco de cada amostra. Uma unidade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzimas que proporciona um aumento de 0,1 de absorbância por mL, por hora de reação.

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o resultado baseado na média aritmética do cálculo da OD (absorbância) x 40 (mL/h). A protease foi multiplicada por 40, pois as unidades, neste caso, foram expressas em mL de amostra por hora: como foram utilizados 100 μL de amostra multiplicou-se a OD por 10 para se obter a unidade em mL; como o ensaio foi realizado em 15 minutos multiplicou-se a OD por 4 para se obter a unidade em horas. Assim, 10 (mL) foi multiplicado por 4 (h) e o produto foi multiplicado pelo valor da OD, obtendo-se a unidade em mL/h.

3.4.10 Análise estatística das atividades enzimáticas

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa BioEstat 5,0. Inicialmente foi realizada uma ANOVA (análise de variância) entre as médias dos índices ou atividades enzimáticas e onde houve significância os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processamento de seis amostras compostas de solos coletadas no Parque Nacional do Viruá e de cinco amostras compostas de solos do Campus Cauamé, foram isoladas leveduras apenas das amostras de solos do Parque Nacional que foram agrupadas, identificadas e testadas quanto a produção de enzimas amilase, celulase, lipase, pectinase, protease e xilanase.

4.1 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DAS AMOSTRAS DE SOLOS

Foram quantificadas cerca de $6,481 \times 10^6$ UFC/mL de leveduras das amostras de solo do Parque Nacional do Viruá. As amostras de solo coletadas no ponto 6, um ambiente de rampas com floresta aberta sob latossolos e cambissolos apresentaram a maior quantidade de isolados $3,104 \times 10^6$ UFC/mL (47,9%); seguido das amostras de solo coletadas no ponto 2, uma região onde predominam latossolos, cambissolos e neossolos litólicos, com $3,002 \times 10^6$ UFC/mL (46,32%); o terceiro com maior frequência de leveduras isoladas foi o ponto 4, um ambiente de mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com parque e campinarana arbóreo-arbustiva em que foram quantificadas $2,2 \times 10^5$ UFC/mL (3,39%); o quarto ambiente com maior frequência correspondeu ao ponto 3, um ambiente de igapó com solos hidromórficos, em que foram quantificadas $1,2 \times 10^5$ leveduras (1,85%); no ponto 1, um ambiente de colinas e encostas dissecadas e florestadas com Cambissolos e Latossolos, houve quantificação de $3,5 \times 10^4$ UFC/mL (0,54%), sendo o quinto com maior frequência de isolados. No ponto 5, por outro lado, não houve isolamento de nenhuma levedura, embora seja um ambiente com as mesmas características de ambiente (relevo, solo e vegetação) do ponto 6, onde houve o maior número de isolados.

De acordo com Cardoso (1992) o solo não deve ser visto como um ambiente uniforme de grande extensão geográfica, pois peculiaridades como a presença de matéria orgânica ou de um microporo saturado de água, variam muito entre locais muito próximos, o que gera um grande número de microhabitats mesmo em um

terreno de pequena dimensão. Assim, amostras coletadas em ambientes similares podem ter diferenças na frequência e diversidade microbiana, tendo em vista que uma simples variação em uma pequena fração do substrato (solo) pode modificar a comunidade microbiana, ou seja, a ocorrência em determinado espaço do solo. Possivelmente, esta seja a explicação para a radical diferença entre as frequências de isolados quando foram comparados os pontos 5 e 6, um com amostras contendo maior frequência de isolados e o outro onde não foram isoladas leveduras, mesmo sendo ambientes semelhantes, de acordo com os critérios amostrais adotados.

Nas parcelas localizadas no módulo do PPBio do Campus Cauamé não houve isolamento de leveduras. Partindo da premissa que os solos de savana são predominantemente distróficos e áridos e que Benedetti et al. (2011) caracterizou os solos da região como distróficos e bem drenados, esses dados estão de acordo com Botha (2006) e Phaff, Miller e Mrak (1966). Segundo estes autores os solos úmidos têm maior diversidade de espécies em relação aos solos áridos e nutricionalmente pobres, tendo que ser considerada também a heterogeneidade do solo que torna desigual a distribuição das espécies microbianas em uma variação temporal de acordo com as variações climáticas. Além disso, vale destacar que a coleta das amostras de solo no Campus Cauamé ocorreu em ano atípico com alta incidência pluviométrica e períodos de enchentes.

Então, a possível ausência de leveduras nos solos do Campus Cauamé, no período da coleta, deve-se a um conjunto dos fatores, enfatizando-se os solos distróficos associados ao clima atípico. Ou seja, a frequência de leveduras no local era baixa, por ser um solo pobre, e estas, devido as enchentes, podem ter sido carregadas, impossibilitando o isolamento nas amostras de solos coletadas. Um aumento no número de pontos poderia ter sido positivo para a obtenção de isolados de leveduras, pois fungos filamentosos e bactérias foram obtidos nessa coleta. Assim, em solos de savana deve-se considerar um aumento no número de pontos de coleta e repetições para obtenção de resultados satisfatórios para o isolamento de leveduras.

A tabela 1 mostra os isolados agrupados sob o código VR (Viruá) nos respectivos pontos de coleta das amostras de solo e as frequências com porcentagem. O ponto 3 foi considerado o mais rico com quatro morfotipos diferentes isolados; seguido do ponto 6 com três morfotipos isolados; o ponto 2 foi o

terceiro com dois; os pontos 1 e 4 tiveram um morfotipo isolado em cada. Ou seja, o ambiente de igapó com solos hidromórficos foi mais propício para uma maior riqueza de morfotipos embora tenha apresentado baixa frequência de UFCs. Já os ambientes de rampas com floresta aberta sob latossolos e cambissolos e de mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com parque e campinarana arbóreo-arbustiva tiveram baixa frequência de UFCs e baixa riqueza de morfotipos.

Tabela 1 – Pontos de coleta de amostras de solo no Parque Nacional do Viruá/RR e frequência dos isolados de levedura.

Código	Ponto	Frequência (UFC/g)	%
VR520	01	$3,5 \times 10^4$	0,54
VR533	02	$2,0 \times 10^3$	0,03
VR535	02	$3,0 \times 10^6$	46,29
VR543	03	$1,0 \times 10^4$	0,15
VR544	03	$9,2 \times 10^4$	1,42
VR545	03	$2,0 \times 10^3$	0,03
VR546	06	$9,4 \times 10^4$	1,45
VR547	03	$1,6 \times 10^4$	0,25
VR558	04	$2,2 \times 10^5$	3,40
VR571	06	$3,0 \times 10^6$	46,29
VR572	06	$1,0 \times 10^4$	0,15

Os isolados das amostras de solo do PARNA Viruá foram agrupados, resultando em 11 morfotipos, 11 códigos VR (tabela 1). A possível perda da biodiversidade durante esse agrupamento foi questionada, mas como o objetivo do trabalho não era diversidade e sim a seleção de leveduras produtoras de enzimas, mantivemos o critério de agrupá-las por morfotipos com base nas características morfológicas.

As colônias de VR520, VR533, VR535, VR544, VR545 e VR558 apresentaram cor creme, brilhosas, forma oval, consistência cremosa e superfície lisa; os isolados VR546, VR547, VR571 e VR572 possuíam cor branca, opacas, forma oval, consistência esfarelada, e superfície rugosa; no isolado VR543 observou-se cor rosada, brilhosa, forma oval, consistência cremosa e superfície lisa.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Para a identificação dos isolados foi realizado um perfil das leveduras através de testes bioquímicos e fisiológicos, complementados com as características morfológicas já descritas, e o sequenciamento da região D1/D2 do 26S do rDNA.

4.2.1 Perfil fisiológico e bioquímico

Os testes fisiológicos e bioquímicos foram realizados para complementar a determinação do perfil dos isolados (tabela 2). Nos testes de crescimento em diferentes temperaturas, somente três isolados (27%) cresceram a 37°C: VR543, VR544 e VR545; enquanto que a 40°C cresceram oito isolados (72%): VR533, VR543, VR544, VR545, VR546, VR547, VR571 e VR572. Nos testes de fermentação três isolados (27%) fermentaram em meio basal: VR533, VR544 e VR545. Cinco isolados (45,4%) foram resistentes a cicloheximida (0,1%): VR520, VR533, VR535, VR543 e VR558; e sete isolados (63,6%) resistentes a NaCl (10%): VR520, VR533, VR535, VR543, VR544, VR545 e VR558.

Nos testes de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio, três isolados (27%) assimilaram duas fontes de nitrogênio: VR520, VR535 e VR558; quatro isolados (27%) assimilaram uma única fonte de nitrogênio: VR533, VR543, VR544 e VR545; e quatro isolados (27%) não assimilaram nenhuma das fontes de nitrogênio testadas: VR546, VR547, VR571 e VR572. Sete isolados (63%) cresceram no meio com 50% de glicose: VR520, VR533, VR535, VR543, VR544, VR545 e VR558.

Quatro isolados assimilaram carbonato: VR533, VR535, VR544 e VR545; e todos os isolados (100%) cresceram na ausência de aminoácidos. Como fontes de carbono, sete isolados (63,64%) assimilaram acima de 14 fontes de carbono diferentes, ou seja possuem um alto perfil de assimilação: VR520, VR533, VR535, VR543, VR544, VR545 e VR558; e quatro isolados (36,36%) assimilaram abaixo de 14 fontes de carbono diferentes: VR 546, VR 547, VR 571, VR 572. Nitrato, ácido acético, eritritol, DL-lactato, metanol, etilacetato e isopropanol não foram assimilados por nenhum dos isolados.

Tabela 2 – Crescimento, fermentação e assimilação de fontes de nutrientes por leveduras isoladas de amostras de solo do Parque Nacional do Viruá/RR.

Leveduras	Crescimento		Fermentação	Assimilação																																																			
	37°C	40°C		MBF	Nitrito	Nitrato	Lisina	10% NaCl	Sem aminoácidos	Cicloheximida	Acido acético	Carbonato	50% glicose	1-Glicose	2-Galactose	3-L-sorbose	4-Maltose	5-Sacarose	6-Celobiose	7-Treose	8-Lactose	9-Melibiose	10-Rafinose (1g)	11-Melzitose	12-Inulina	13-Amido solúvel	14-D-xilose	15-L-arabinose	16-D-arabinose	18-L-raminose	19-Etanol	20-Glicerol	21-Eritritol	22-Ribitol (adonitol)	23-Galactitol (dulcitol)	24-D-manitol	25-D-glucitol (sorbitol)	27-Salicina	31-DL-Lactato	32-Succinato	33-Citrato de sódio	34-M-inositol	35-Metanol	36-Hexadecano	37-Glucosamina	38-Xilitol	39-Acetona	40-Etilacetato	41-Isopropanol	42-Gluconato	43-N-acetilglucosamina				
VR533	-	3	3	-	-	3	3	3	3	-	3	3	3	3	3	-	-	3	3	3	3	-	-	-	-	-	1	2	3	-	3	3	-	-	3	3	3	3	3	-	3	3	-	3	-	-	-	3	3						
VR535	-	-	-	3	-	3	3	3	3	-	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	3	-	-	3	3	1	3	-	3	-	3	-	3	-	-	-	-	3	1	-	-	3	3	
VR558	-	-	-	3	-	3	3	3	3	-	-	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	3	-	-	3	3	1	3	-	3	-	3	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	3	3	
VR520	-	-	-	3	-	3	3	3	3	-	-	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	-	3	-	-	3	3	1	3	-	3	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	3	
VR544	3	3	3	-	-	3	3	3	-	-	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	3	-	3	-	3	3	3	3	-	3	3	2	-	-	2	-	3	3	-	-	1	3		
VR545	3	3	3	-	-	3	3	3	-	-	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	2	3	3	-	3	-	3	-	3	3	3	-	3	2	-	-	2	2	3	3	-	-	-	3			
VR571	-	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
VR572	-	2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	
VR546	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	
VR547	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-		
VR543	3	3	-	-	-	1	3	3	3	-	-	2	3	3	2	3	3	3	1	3	2	2	3	3	2	-	3	3	3	2	-	3	-	-	-	2	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-			

Legenda: (-)= ausência de crescimento; 1= crescimento fraco; 2= crescimento médio; 3= crescimento forte da colônia na placa observada.

Analisando os resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos constatou-se cinco perfis diferentes de leveduras: o primeiro perfil composto pelos isolados VR544 e VR545, diferindo apenas nos níveis de assimilação de gluconato, L-arabinose e glicosamina; o segundo perfil formado pelos isolados VR520, VR535 e VR558, diferindo apenas na baixa assimilação de carbonato e acetona por VR535 e na não assimilação de xilitol por VR520; o terceiro perfil composto apenas pelo isolado VR533 que apesar de ter características semelhantes ao primeiro perfil, assimila nove fontes de carbono a menos; o quarto perfil compreende as características do isolado VR543, que embora tenha um amplo perfil de assimilação e se assemelhando ao primeiro e segundo perfil nas características fisiológicas e bioquímicas, nos testes morfológicos teve coloração diferente; o quinto e último perfil foi composto pelos isolados VR546, VR547, VR571 e VR572 que tiveram um baixo perfil assimilativo de apenas seis fontes de nutrientes e que diferiram nos níveis de crescimento em quatro destas fontes: ausência de aminoácidos, glicose, galactose, inulina e acetona.

Vital et al. (2002), em estudo com leveduras de solos da Estação Ecológica de Maracá/RR, observaram que 60% dos isolados possuíam amplo perfil assimilativo e 40%, baixo perfil de assimilação de fontes de carbono. Resultados semelhantes foram obtidos nesta pesquisa com isolados de solos do PARNA Viruá, onde 63% apresentaram amplo perfil assimilativo e 36%, baixo. Algumas diferenças observadas entre o perfil dos isolados das duas pesquisas pode ser destacado, entre elas a assimilação de etanol pela maioria dos isolados no estudo anterior e a baixíssima assimilação desta fonte de carbono pelos isolados em questão, o que evidencia um baixo poder fermentativo das leveduras provenientes de solos do PARNA Viruá. A variação no perfil assimilativo observado pode ser explicada, quando considera-se o solo como um reservatório natural onde as leveduras com afinidade basidiomicética possuem um amplo perfil assimilativo, e as ascomicéticas, necessidades nutricionais restritas a poucas fontes de carbono. Assim, essa variação confirma a presença dos dois grupos de leveduras nos solos do PARNA VIRUÁ/RR (KURTZMAN; FELL, 1998).

Outra diferença observada foi o crescimento da maioria dos isolados do PARNA Viruá a temperatura de 40°C, enquanto que Vital et al. (2002) verificaram a

prevalência do crescimento dos isolados de Esec Maracá/RR em 37°C. Estes resultados indicam um caráter termofílico das leveduras dos solos roraimenses e seu potencial em reações que necessitem ocorrer em temperaturas mais elevadas.

4.2.2 Caracterização molecular

A identificação dos onze morfotipos foi realizada em nível de espécie através do sequenciamento da região D1/D2 do DNA ribossomal 26S. As sequências foram comparadas com as sequências contidas no GenBank do NCBI pelo programa BLAST (tabela 3). Com base nos resultados, as porcentagens de similaridades maiores ou iguais a 99% correspondem a sequências semelhantes à de espécies já descritas na literatura e depositadas no banco de dados; porcentagens de similaridades menores ou iguais a 98% correspondem a sequências de espécies diferentes das depositadas, sendo assim consideradas como espécies novas de leveduras. As comparações de similaridade foram realizadas considerando-se os domínios D1/D2.

O isolado VR533 apresentou 90% de similaridade quando sua sequência foi alinhada com a sequência de *Candida bituminiphila* (GenBank AF294910.1), com 1% de substituição. Embora o isolado VR533 esteja mais próximo da espécie *C. bituminiphila* essa similaridade foi considerada baixa por estar aquém de 98%, sendo então considerado como possível espécie nova do gênero *Candida* (assexuado). Devido à baixíssima similaridade com *C. bituminiphila*, pertencente ao clado Sugiyamaella, testes mais específicos devem ser realizados para determinar a que clado este isolado deve ser inserido para assim receber o gênero sexuado.

As sequências dos isolados VR520, VR535 e VR558 quando pareadas com *Cryptococcus podzolicus* (GenBank AF075481.1) apresentaram 99% de similaridade. Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), esta espécie pode ocorrer amplamente em solos sob vegetação em zonas climáticas diferentes. Segundo os autores, *Cr. podzolicus* foi isolado de diferentes amostras de solo e de rizosfera em vários continentes. O presente estudo registra a primeira ocorrência da espécie em amostras de solos de Roraima.

Tabela 3 – Identificação molecular das leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR através do sequenciamento do rDNA 26S.

Código	Espécie	Espécie pareada no Genbank	Similaridade
VR 520	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	99%
VR 533	<i>Candida</i> sp.*	<i>Candida bituminiphila</i>	90%
VR 535	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	99%
VR 543	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99%
VR 544	<i>Candida pseudointermedia</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	99%
VR 545	<i>Candida pseudointermedia</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	99%
VR 546	<i>Yarrowia</i> sp.*	<i>Candida hispaniensis</i>	97%
VR 547	<i>Yarrowia</i> sp.*	<i>Candida hispaniensis</i>	97%
VR 558	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	99%
VR 571	<i>Yarrowia</i> sp.*	<i>Candida hispaniensis</i>	97%
VR 572	<i>Yarrowia</i> sp.*	<i>Candida hispaniensis</i>	97%

(*) – leveduras consideradas como possíveis espécies novas.

A sequência do isolado VR543 quando pareado com a de *Rhodotorula mucilaginosa* (GenBank FJ874772.1) apresentou 99% de similaridade com 1% de substituição. Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), esta espécie é possivelmente a mais onipresentes dentre as leveduras basidiomicetas. Além de uma provável associação com os seres humanos, a *R. mucilaginosa* é encontrada em uma ampla variedade de condições naturais, incluindo componentes de vida ou em decomposição de plantas e solo; além de vários ambientes aquáticos, incluindo os lagos de águas doces, os estuários, as águas costeiras, em ambientes abertos para o mar e de águas profundas. Além disso, *R. mucilaginosa* também está presente em ambientes extremos, como águas ultra-ácidas, lixiviados de urânio, e ambientes frios. Várias aplicações biotecnológicas têm sido propostas, variando de biorremediação até à produção de pigmentos. Estudos têm indicado que esta espécie deve ser incluída na lista de patógenos oportunistas, sendo provavelmente a única do gênero que causa infecções em humanos.

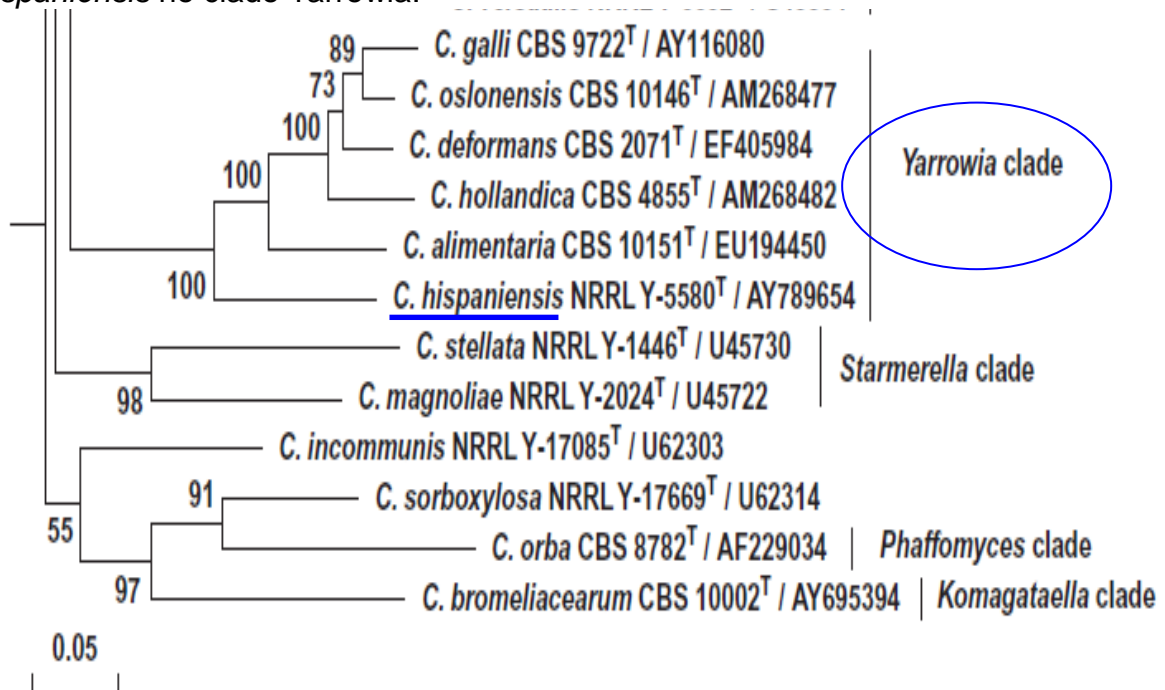
As sequências dos isolados VR544 e VR545 quando alinhadas com a sequência de *Candida pseudointermedia* (GenBank U44816.1) apresentaram 99% de similaridade, sem nenhuma substituição. Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) enfatizam, a existência de poucos relatos sobre a espécie, destacando o registro de possível associação da espécie com flores e insetos polinizadores, e o desconhecimento da importância desta levedura na área biotecnológica, clínica, de alimentos e na agricultura.

As sequências dos isolados VR546, VR547, VR571 e VR572 foram alinhadas com a de *Candida hispaniensis* e apresentaram 97% de similaridade com mais de 1% de substituição, e identificados como espécies novas do gênero *Yarrowia*. O gênero *Candida* atualmente não é mais utilizado em determinação de novas espécies, pois representa apenas a fase assexuada da levedura. Os clados são compostos por leveduras com fase sexuada descrita, e leveduras inicialmente descritas na fase assexuada, mas que com o avanço dos estudos taxonômico já possui uma nomenclatura referente a fase sexuada. Assim, devido ao processo de atualização taxonômica, as espécies novas pareadas com leveduras descritas apenas na fase assexuada devem ser incorporadas ao clado já com o gênero

sexuado. Neste caso, devido a espécie pareada estar inserida no clado *Yarrowia* (figura 13) os quatro isolados foram determinados como *Yarrowia* sp.

No presente estudo foram isoladas leveduras pertencentes a quatro gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia* e; pelo menos, cinco espécies diferentes dentre as onze morfotipos de leveduras. Exceto pela ocorrência do gênero *Yarrowia*, os demais gêneros: *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* foram encontrados por Vital et al. (2002) nas amostras de solos da Estação Ecológica de Maracá/RR, ampliando a distribuição desses três gêneros em solos roraimenses. Além do relato de ocorrência de *Yarrowia* um gênero ainda não descrito nos solos da região. Este gênero foi encontrado somente nas amostras de solo coletadas em dois ambientes distintos: solos hidromórficos, e outro onde predominam combinação de Latossolos e Cambissolos.

Figura 13 – Filograma da análise do sequenciamento dos domínios D1/D2 do rRNA de espécies de *Candida*, em destaque a inserção da fase sexuada de *C. hispaniensis* no clado *Yarrowia*.



Fonte: modificado de Kurtzman, Fell e Boekhout (2011).

4.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE EXTRACELULAR DE AMILASE, CELULASE, LIPASE, PROTEASE, PECTINASE E XILANASE

A tabela 4 sintetiza a análise das leveduras frente a atividade qualitativa das enzimas amilase, celulase, lipase, pectinase em pH 5 e pH 7, protease e xilanase.

4.3.1 Avaliação da produção de amilase, celulase e pectinase em pH 5

Nos testes enzimáticos qualitativos as leveduras testadas não foram capazes de liberar enzimas para degradar os substratos amido e hemicelulose, sendo classificadas como não produtoras, respectivamente, de amilase e celulase. Bem como a atividade de pectinase em pH 5 não foi observada e que será tratada com mais detalhes no item 4.3.2.

Fuentefria e Valente (2005), ao analisarem leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*, e Mautone et al. (2010), ao analisarem leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras, obtiveram índices satisfatórios utilizando a mesma técnica utilizada neste trabalho, 22% e 29% de isolados produtores de amilase, respectivamente, resultados diferentes dos encontrados nesta pesquisa, onde não se detectou produção da enzima pelos isolados testados. Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa² ao analisar a produção da amilase por leveduras coletadas dos solos do PARNA Viruá, utilizando uma metodologia diferente descrita por Gopinath, Anbu e Hilda (2005), com modificação no meio de cultura, obteve resultados positivos em apenas 5% dos isolados, demonstrando uma baixa capacidade de produção.

² Grupo de Pesquisa Substâncias Bioativas, líder professor Marcos Vital, trabalho em preparação.

Tabela 4- Síntese da atividade enzimática qualitativa das leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.

Leveduras	<u>Amilase</u>	<u>Celulase</u>	<u>Pectinase</u> (pH5)	<u>Pectinase</u> (pH7)	<u>Protease</u>	<u>Lipase</u>	<u>Xilanase</u>
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR 520)	-	-	-	++	+	-	++
<i>Candida</i> sp.* (VR 533)	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR 535)	-	-	-	++	+	-	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (VR 543)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida pseudointermedia</i> (VR 544)	-	-	-	-	+	-	-
<i>Candida pseudointermedia</i> (VR 545)	-	-	-	-	+	-	-
<i>Yarrowia</i> sp.* (VR 546)	-	-	-	-	+	++	-
<i>Yarrowia</i> sp.* (VR 547)	-	-	-	-	+	++	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR 558)	-	-	-	++	+	-	++
<i>Yarrowia</i> sp.* (VR 571)	-	-	-	-	+	++	-
<i>Yarrowia</i> sp.* (VR 572)	-	-	-	-	+	++	-

Legenda: negativo (-); positivo: (+); positivo forte: (++); *: possíveis espécies novas.

A não produção de celulase pelos isolados de leveduras de solos de ambientes florestais corroboram os resultados de Buzzini e Martini (2002) que não obtiveram resultados positivos em nenhuma das 397 cepas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas de ambientes tropicais testadas. Entretanto, Fuentesfria e Valente (2005) utilizando isolados de filoplano, Strauss et al. (2001) de vinícolas, e as pesquisas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa² com isolados de solos de florestas são alguns dos poucos trabalhos em que as leveduras testadas apresentaram atividade celulolítica na utilização do substrato carboximetilcelulose. As diferenças entre os resultados obtidos nas diferentes pesquisas podem ser explicadas pela origem das leveduras e maior habilidade em excretar enzimas celulolíticas de acordo com o ambiente. No caso de leveduras de solo essa habilidade vai depender da oferta e necessidade de explorar nutricionalmente esse substrato específico.

Com base nos resultados obtidos, o emprego dos isolados testados nesta pesquisa para produção de amilase e de celulase não se mostraram eficientes para estudos quantitativos que visem o emprego industrial, exceto se outras técnicas forem utilizadas para detecção da atividade.

4.3.2 Avaliação da produção de pectinase em pH 7

Apenas três leveduras (27%) apresentaram halo de degradação de pectina em pH 7: *Cryptococcus podzolicus* (VR535), *Cr. podzolicus* (VR558) e *Cr. podzolicus* (VR520). A tabela 5 mostra os índices enzimáticos (ie) e o padrão $ie > 1,0$. Nos demais isolados não foi observado halo de degradação em torno das colônias. Por todos serem da mesma espécie é relevante destacar a espécie *Cr. podzolicus* na produção extracelular de pectinase nesta pesquisa. A não produção da enzima quando os isolados foram testados em pH 5 mostra a dificuldade dos isolados em secretar a enzima pectinase em meio mais ácido e a preferência por meio mais neutro.

Vários trabalhos pesquisaram a produção de pectinase por leveduras, destacando o de Oliveira et al. (2009) que isolaram uma levedura do gênero

Cryptococcus produtora de pectinase coletada do semi-árido baiano. Strauss et al. (2001) estudaram 245 cepas de leveduras de vinícolas e obtiveram 3,67% das leveduras testadas positivas para detecção da produção da enzima pectinase. Já Buzzini e Martini (2002) avaliaram 397 cepas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras oriundas de diversos habitats tropicais e destacaram o potencial que diversos grupos de leveduras têm em produzir pectinase, bem como a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência de leveduras pectinolíticas nos mais variados ambientes.

Desta forma, o presente estudo contribui com novos dados de ocorrência de leveduras do gênero *Cryptococcus* em solos brasileiros, além de destacar a potencial capacidade do gênero em produzir a enzima pectinase. Ou seja, além de um novo registro de ocorrência, foi possível trazer mais dados sobre produção de pectinase por leveduras isoladas de um ambiente protegido e pouco explorado pela Microbiologia.

Tabela 5 – Atividade enzimática qualitativa de pectinase em meio básico produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.

	Dc	Dh	ie	ie>1,00
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR535)	0,9	2,2	2,44 ^a	++
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR558)	1,2	2,4	2,00a	++
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR520)	1,1	2,4	2,18 ^a	++

dc= diâmetro da colônia; dcp= diâmetro médio da colônia acrescido do diâmetro do halo; ie= índice enzimático (ie=dh/dc). a= as médias dos índices enzimático da pectina não diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p<0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais correspondem a diferenças não significativas entre as médias.

Através de testes estatísticos os isolados analisados não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos índices enzimáticos, ou seja, nenhum dos isolados liberou pectinase para o meio mais que outro. Assim, tendo em vista que os três isolados tiveram alto índice enzimático e tiveram um mesmo perfil de produção da enzima, todas podem ser testadas quantitativamente visando o emprego industrial.

4.3.3 Avaliação da produção de protease

Nas análises de produção de protease, dez isolados (cerca de 90%) testados foram positivos nos testes qualitativos. Apenas *Rhodotorula mucilaginosa* (VR 543) não apresentou halo de degradação. Todas as demais cepas tiveram índices enzimáticos considerados baixo, por possuírem ie superior a 0,2 e inferior a 1,0. Os índices enzimáticos ficaram entre 0,31 e 0,54, estatisticamente as diferenças entre as médias dos índices não tiveram valores significativos (tabela 6).

Apesar da atividade proteolítica detectada nos isolados não ter sido alta, os resultados obtidos corroboram as porcentagens de isolados positivos do grupo de pesquisa³ que utilizando leveduras oriundas de solos roraimenses da mesma região observou que mais de 80% das leveduras testadas foram boas produtoras de protease utilizando metodologia diferente da empregada nesta pesquisa, em que 90% das leveduras foram produtoras; e com os resultados de Silva Neves, Porto e Teixeira (2006) que observaram que 98% das leveduras de ambientes amazônicos testadas tinham atividade proteolíticas, valores esses muito satisfatórios no que se refere a seleção de enzimas proteolíticas. Resultados menos promissores foram observados por Buzzini e Martini (2002) e Strauss et al. (2001) que obtiveram percentuais inferiores aos obtidos nesta pesquisa (90%), com leveduras de diversos habitats tropicais, com 15,6% e 4,1% de isolados com atividade proteolítica positiva, respectivamente.

Comparando os resultados das pesquisas relatadas anteriormente pode-se inferir que a atividade proteolítica mostra-se variável entre as leveduras. Assim, tendo em vista que várias espécies de leveduras têm sido descritas como produtoras de proteases: *Candida tropicalis*, *C. novyensis*, *Saccharomyces chevalieri*, *Torulopsis candida*, *C. macedoniensis*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*, *Geotrichum lactis*, *Aureobasidium pullulans*, *K. lactis*, *Rhodotorula rubra* (TRINDADE et al., 2004), faz-se necessário estudos quantitativos

³ Grupo de Pesquisa Substâncias Bioativas, líder professor Marcos Vital, trabalho em preparação.

utilizando outras metodologias e parâmetros para verificar os tipos de proteases, com especificidade de substratos nas pesquisas de detecção de produção desta enzima por esses micro-organismos.

Tabela 6 – Atividade enzimática qualitativa de protease produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.

Leveduras	Dc	Dcp	ie	ie >0,2<1,0
<i>Candida</i> sp.(VR 533)	0,9	0,39	0,43a	+
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR 535)	1,0	0,50	0,50a	+
<i>Cr. podzolicus</i> (VR558)	0,9	0,49	0,54a	+
<i>Cr. podzolicus</i> (VR520)	0,9	0,49	0,54a	+
<i>Candida pseudointermedia</i> (VR 544)	1,1	0,50	0,45a	+
<i>C. pseudointermedia</i> (VR 545)	1,0	0,49	0,49a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 571)	0,9	0,35	0,38a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 572)	1,0	0,31	0,31a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 546)	1,2	0,39	0,32a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 547)	1,0	0,41	0,41a	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (VR 543)	1,1	0,00	0,00*	-

dc= diâmetro da colônia; dcp= diâmetro médio da colônia acrescido do diâmetro do halo; ie= índice enzimático (ie=dh/dc). a= as médias dos índices enzimático da pectina não diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0).*media não testada estatisticamente. Letras iguais correspondem a diferenças não significativas entre as médias.

4.3.4 Avaliação da produção de xilanase

Apenas três leveduras (27%) apresentaram halo de degradação da xilana: *Cryptococcus podzolicus* (VR535), *Cr. podzolicus* (VR558) e *Cr. podzolicus* (VR520). Nas demais leveduras não foi visualizado halo ao redor das colônias. Os valores dos testes positivos estão na tabela 7, onde os índices enzimáticos superaram o valor padrão (>1,0) tendo como resultado uma alta atividade enzimática. Fuentesfria e Valente (2005) e Strauss et al. (2001) obtiveram valores semelhantes em seus testes, embora os isolados tenham sido coletados de ambientes diferentes. A presença de leveduras produtoras de xilanase em solos pode ser influenciada pela cobertura vegetal da região.

Os três isolados de *Cr. podzolicus* apresentaram um bom perfil enzimático para testes quantitativos frente a produção da enzima xilanase e para sua utilização

em fins industriais, tendo em vista que além dos ótimos resultados obtidos neste teste os mesmos isolados tiveram ótima produção da enzima pectinase em pH 7. Esse bom desempenho em duas avaliações distintas é um indicador importante do potencial econômico desses isolados.

Tabela 7 – Atividade enzimática qualitativa de xilanase produzida por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.

	Dc	Dh	le	ie>1,00
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR535)	0,9	2,2	2,44 ^a	++
<i>Cr. podzolicus</i> (VR558)	0,8	1,9	2,37 ^a	++
<i>Cr. podzolicus</i> (VR520)	0,8	2,0	2,5 ^a	++

dc= diâmetro da colônia; dcp= diâmetro médio da colônia acrescido do diâmetro do halo; le= índice enzimático (ie=dh/dc); a= as médias dos índices enzimático da pectina não diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais correspondem a diferenças não significativas entre as médias.

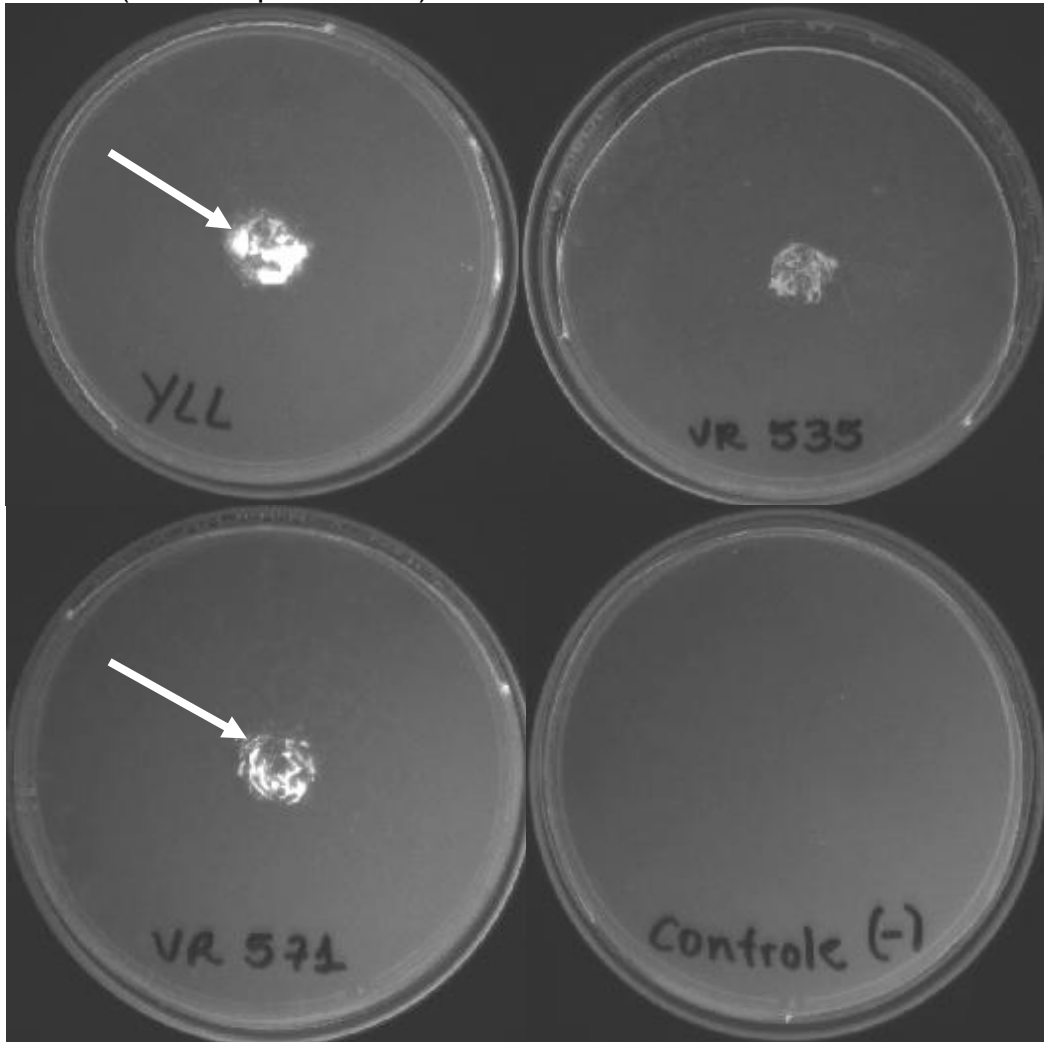
4.3.5 Avaliação da produção de lipase

Na avaliação da produção de lipase qualitativamente foram empregadas duas técnicas: testes de triagem de lipase por rodamina B e teste de seleção primária de lipase. Em ambos os testes foi utilizada uma placa sem inóculo como controle negativo e uma cepa de *Yarrowia lipolytica* como controle positivo.

4.3.5.1 Teste de triagem de lipase por rodamina B

Na triagem das leveduras produtoras de lipase pela técnica da rodamina B cinco (45%) produziram fluorescência evidenciando possível quebra de substrato por lipase extracelular: *Rhodotorula mucilaginosa* (VR 543), *Yarrowia* sp. (VR546), *Yarrowia* sp. (VR547), *Yarrowia* sp. (VR571) e *Yarrowia* sp. (VR572). Nos testes com as demais leveduras não foi visualizada fluorescência, o que indica a não produção de lipase pelos isolados neste teste (figura 14).

Figura 14– Teste de triagem de lipase por rodamina B, utilizando isolados provenientes de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, caracterizado pela fluorescência (indicada pelas setas).



Legenda: YLL: *Yarrowia lipolytica*= positiva; VR535: *Cr. podzolicus*= negativa; VR571= *Yarrowia* sp.; controle negativo.

Os resultados obtidos nesta pesquisa para produção de lipase (45%) foram superiores aos verificados pelo grupo de pesquisa⁴, que utilizando metodologia semelhante, meio Gorodkova (glicose 0,1%, peptona 1%, NaCl 0,4%, ágar 1,5%)

⁴ Grupo de Pesquisa Substâncias Bioativas, líder professor Marcos Vital, trabalho em preparação.

suplementado com 2% de óleo de oliva extra virgem e 1% de solução de corante rodamina B, observou que 26,98% mostraram habilidade para produzir lipases.

Resultados equivalentes foram reportados por Fuentefria e Valente (2005) utilizando Tween 20, detectaram a atividade em 40% das 84 cepas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras avaliadas; e Buzzini e Martini (2002) obtiveram resultados similares na avaliação de 397 linhagens, 40,3% das cepas investigadas apresentaram habilidade para produzir enzimas com atividade sobre trioleína, substrato padrão para lipases (JAEGER; EGGERT, 2002), e tributirina. Vale ressaltar que esse é um teste de triagem e que a liberação de outros compostos e até esterases podem indicar um resultado falso-positivo nesses testes. Mesmo assim esses testes são eficazes para fazer uma seleção primária das leveduras testadas, levando em consideração a quantidade que geralmente são testadas, e os gastos elevados nos testes secundários.

4.3.5.2 Teste de seleção primária de lipase

Das 11 leveduras testadas, quatro (36%) apresentaram halo de degradação: *Yarrowia* sp. (VR546), *Yarrowia* sp. (VR547), *Yarrowia* sp. (VR571) e *Yarrowia* sp. (VR572). A tabela 8 mostra as leveduras com teste positivo e o cálculo do índice enzimático. Todas as leveduras positivas ficaram acima do padrão descrito por Colen, Junqueira; Santos (2006) e, Gonçalves, Colen e Takahashi (2013), 1,4 e 1,0, respectivamente. As demais leveduras não produziram halo e foram consideradas negativas. As leveduras positivas passaram para os testes secundários que mediu a atividade lipásica quantitativamente.

Gonçalves, Colen e Takahashi (2013) ao testarem onze leveduras utilizando a mesma metodologia obtiveram apenas uma cepa promissora. Nos testes com as demais cepas onde houve visualização de halo transparente ao redor da colônia os valores foram iguais a 1, não sendo relevantes na pesquisa. Todos os resultados apresentados pelos autores citados ficaram abaixo dos valores encontrados nesta pesquisa. Ensaio de fermentação submersa de lipase são os indicados para

confirmação quantitativa, além do emprego de diferentes substratos lipásicos e variações de temperatura e pH.

Tabela 8 – Atividade enzimática qualitativa de lipase produzida por leveduras do gênero *Yarrowia* isoladas do Parque Nacional do Viruá/RR.

Leveduras	dc	Dh	le	ie > 1,0
<i>Yarrowia lipolytica</i> (controle-UFMG)	1,5	2,9	1,93 ^a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 571)	1,5	2,8	1,86 ^a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR 572)	1,5	3,1	2,06 ^a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR546)	1,5	3,5	2,33 ^a	+
<i>Yarrowia</i> sp. (VR547)	1,5	3,0	2,00 ^a	+

dc= diâmetro da colônia; dcp= diâmetro médio da colônia acrescido do diâmetro do halo; le= índice enzimático (ie=dh/dc). As médias dos índices enzimático da lipase não diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0).* Letras iguais correspondem a diferenças não significativas entre as médias.

4.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE LIPASE POR LEVEDURAS DE SOLO

Nessa avaliação apenas as leveduras VR546, VR547, VR571 e VR572 consideradas positivas nos testes qualitativos para a produção extracelular de lipase foram testadas quanto a quantificação de ácidos graxos, atividade de lipase e atividade de protease.

4.4.1 Quantificação de ácidos graxos por titrimetria

A quantificação de ácidos graxos é empregada como a seleção secundária da produção lipásica. Neste teste quantitativo, que avaliou a quantidade de ácidos graxos que foram hidrolizados no meio e que através de titulação dá valores

utilizados nos cálculos de atividade enzimática, observou-se uma atividade enzimática que variou de 1,0 a 3,6 unidades enzimáticas, conforme a tabela 9.

A tabela 9 mostra os valores de atividade enzimática onde U representa as unidades enzimáticas da reação. A levedura *Yarrowia* sp. (VR546) apresentou valores acima do apresentado pelo controle. Enquanto que *Yarrowia* sp. (VR571), *Yarrowia* sp. (VR572) e *Yarrowia* sp. (VR547), valores abaixo do padrão. Estes resultados são superiores aos de Gonçalves, Colen e Takahashi (2013) que variaram entre 0,37 e 1,2 U/mL e evidenciam principalmente a levedura *Yarrowia* sp. (VR546) como promissora em estudos mais aprofundados de produção lipásica em cultivo submerso.

Tabela 9 – Atividade enzimática quantitativa de lipase produzida por leveduras do gênero *Yarrowia* isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, por técnicas de titrimetria.

Leveduras	Controle	VR571	VR572	VR546	VR547
U	2,39ab	1,2c	2.1b	3.6a	1.0c

U= unidades enzimáticas por mL. As médias das atividade da lipásicas diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas.

4.4.2 Determinação da atividade de lipase por espectrofotometria

Na determinação da atividade quantitativa por espectrofotometria, apenas os isolados de *Cryptococcus podzolicus* (VR535) e *Yarrowia* sp. (VR571) foram testados, sendo o primeiro negativo e o segundo positivo para produção de lipase extracelular. Os dados obtidos confirmaram os resultados qualitativos, embora a quantificação tenha sido baixa tanto nesta metodologia quanto na metodologia relatada anteriormente no item 4.4.1, no qual foi realizada a quantificação de ácidos graxos por titrimetria.

A tabela 10 mostra os valores de absorbância, as médias e os valores de U (unidades enzimáticas) dos isolados testados. Os valores de atividade enzimática confirmam a não produção de lipase por *Cr. podzolicus* (VR 535), evidenciada nos testes qualitativos e uma baixa produção de lipase por *Yarrowia* sp. (VR571),

semelhante aos resultados dos testes qualitativos, e muito abaixo do valor do controle utilizado no experimento. Isso corrobora as afirmações de Carvalho et al. (2003) onde, segundo eles, a produção de enzimas tem sido relatada para um destacado grupo de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* e *Torulospora*.

Bussamara et al. (2010) obtiveram maiores valores de atividade enzimática, entre 0,002U/mL e 0,611U/mL, utilizando a mesma técnica – exceto pela utilização de dois indutores: óleo de oliva e gordura animal – para investigar a produção e imobilização de lipases de *Pseudozyma hubeiensis* isoladas de superfície foliar da planta do *Hibiscus rosa-sinensis*, com finalidade biotecnológica. Assim, tornam-se necessários testes com as demais leveduras isoladas nesta pesquisa para que haja uma melhor compreensão do potencial que têm em produzir lipase por esta metodologia.

Tabela 10 – Atividade enzimática quantitativa de lipase por leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, utilizando técnicas espectrofotométricas.

IDENTIFICAÇÃO	Repetições			MÉDIA*	U.mL ⁻¹
	1	2	3		
<i>Yarrowia lipolytica</i> (controle)	1,700	1,796	1,762	1,734	0,058 ^a
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (VR535)	0,063	0,057	0,074	0,04	NÃO
<i>Yarrowia</i> sp. (VR571)	0,199	0,216	0,211	0,190	0,006 ^b

*Valor da média das triplicatas com o valor do branco descontado. As médias das atividade da lipásicas diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias.

Diversos trabalhos têm testado o potencial das leveduras nas mais variadas condições: Feitosa et al. (2010), utilizando uma técnica diferente da empregada neste estudo para analisar a produção de lipase por meio de micro-organismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo, obtiveram as maiores atividades lipolíticas sob a concentração de indutor – óleo de palma – a 4%, pH 7,0 e temperatura a 37°C, tendo 5,48 a 6,77 U/mL. De acordo com Pinheiro et al. (2008), temperaturas na faixa de 29 e 45°C e valores de pH entre 7,0 e 8,5 representam as condições ótimas de atividade lipolítica. Com base nisto, provavelmente a realização de mais testes incluindo variações de pH, temperatura e diferentes indutores podem

mostrar resultados mais significativos com as leveduras isoladas nesta pesquisa, levando em consideração o fato de serem de ambiente pouco explorado com condições diversificadas.

Segundo Hasan, Shah e Hameed, (2006), lipases isoladas de diferentes fontes apresentam uma ampla variação de propriedades Talvez a utilização de temperaturas e pH semelhantes ao ambiente em que foram coletadas e um indutor extraído de plantas da região sejam algo a ser considerado na adaptação de protocolos, pois a maioria dos protocolos padrões seguidos nesses testes são de acordo com pesquisas realizadas com micro-organismos da região Sudeste e Sul, não tendo protocolos específicos para leveduras da região amazônica. Assim, os resultados da presente pesquisa no que se refere a *Yarrowia* sp. (VR 571) podem ser otimizados se empregados outros substratos, tendo em vista que os resultados da determinação de protease mostraram uma baixíssima produção dessa enzima quando comparada com as demais cepas testadas (tabela 11).

Tabela 11 – Atividade enzimática quantitativa de protease de leveduras isoladas de solos do Parque Nacional do Viruá/RR, por técnicas de espectrofotometria.

IDENTIFICAÇÃO		1	2	3	MÉDIA*	U
<i>Yarrowia lipolytica</i> (controle)	48h	0,03	0,02	0,01	0,02	0,8
VR535	48h	0,011	0,008	0,014	0,011	0,44
VR571	48h	0,005	0,004	0,005	0,004	0,16

*Valor da média das triplicatas com o valor do branco descontado.

A tabela 11 mostra os valores da absorbância, as médias destes valores e o valor de U (unidades enzimáticas) dos isolados do PARNA Viruá e do controle utilizado. O isolado VR571 (*Yarrowia* sp.) teve menor atividade proteolítica, o que é uma característica boa para micro-organismos avaliados quanto a produção de enzimas específicas para fins industriais e que precisam manter uma certa uniformidade durante todo o processo de reação com pouca degradação causada pelas proteases.

4.5 PRODUÇÃO DE MULTIENZIMAS

Cerca de 90% das leveduras testadas produziram, pelo menos, um tipo de enzima (VR520, VR533, VR535, VR544, VR545, VR558, VR546, VR547, VR571 e VR572); 63% produzem pelo menos duas enzimas (VR520, VR535, VR558, VR546, VR547, VR571 e VR572) e que 27% (VR520, VR535, e VR558) produzem pelo menos três tipos de enzimas diferentes (tabela 4). Nos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa⁵ foi verificado que as leveduras de solo testadas em seu trabalho possuíam essa característica em secretar mais de uma enzima e que seus isolados exibiam bom desempenho nos testes, sendo excelentes candidatos a estudos mais detalhados para viabilizar sua aplicação em processos industriais.

Os resultados alcançados nesta pesquisa ampliaram o conhecimento sobre a ocorrência de leveduras nos solos roraimenses, destacando-se o isolamento de espécies novas. Além disso, a habilidade dos isolados em secretar enzimas de interesse industrial foi evidenciada e quantificada. A viabilidade econômica da utilização dos isolados poderá ser verificada com a aprofundada caracterização da influência de parâmetros como pH, temperatura e substratos indutores. Assim, os resultados desta pesquisa corroboram a importância das áreas protegidas como fontes de novas espécies, inclusive com especial interesse para a Biotecnologia.

⁵ Grupo de Pesquisa Substâncias Bioativas, líder professor Marcos Vital, trabalho em preparação.

5 CONCLUSÕES

Não houve isolamento de leveduras das amostras de solos do Campus Cauamé/RR. Entretanto, estes micro-organismos foram isolados das amostras de solos do Parque Nacional do Viruá/RR.

A maior frequência de leveduras foi obtida em ambiente de rampas com floresta aberta sob latossolos e cambissolos, e a menor em ambiente de colinas e encostas dissecadas e florestadas com cambissolos e latossolos.

As características de solos e fitofisionomias não influenciaram na quantificação das leveduras.

O ambiente mais rico foi observado em igapó com solos hidromórficos; enquanto a menor riqueza foi evidenciada em dois ambientes: colinas e encostas dissecadas e florestadas com cambissolos e latossolos, e mosaico de patamares arenosos baixos inundáveis com parque e campinarana arbóreo-arbustiva.

Os isolados apresentaram cinco perfis fisiológicos e bioquímicos diferentes, destacando que nitrato, ácido acético, eritritol, DL-lactato, metanol, etilacetato e isopropanol não foram assimilados por nenhum dos isolados, e um comportamento termofílico.

As leveduras testadas apresentaram baixo perfil de assimilação de fontes de carbono e hidrogênio e foram identificados nos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia*.

Foram identificados dois isolados de *Cryptococcus podzolicus*, dois de *Candida pseudointermedia*, um de *Rhodotorula mucilaginosa*, e cinco morfotipos foram identificados como novas espécies, sendo quatro *Yarrowia* spp. e um *Candida* sp. que estão em fase de descrição.

A produção de protease foi verificada em todos os morfotipos, exceto por *Rhodotorula mucilaginosa*; os isolados identificados como *Yarrowia* sp. produziram lipase em diferentes concentrações; os de *Cryptococcus podzolicus* produziram xilanase e pectinase. A produção qualitativa confirmou a quantitativa na produção de lipase.

A produção multienzimática foi observada nas leveduras identificadas como *Yarrowia* sp, que produziu lipase e protease, e *Cryptococcus podzolicus*, que

produziu pectinase, protease e xilanase. Entretanto, nenhum dos isolados testados produziu amilase ou celulase.

As perspectivas para futuros estudos, no que diz respeito as enzimas produzidas pelas leveduras, incluem: avaliação da atividade enzimática utilizando outros substratos, otimização dos parâmetros críticos na produção de enzimas via fermentação submersa, caracterização e produção em escala semi-industrial da enzima produzida pelos isolados mais promissores nos testes quantitativos.

REFERÊNCIAS

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Delft, v. 29, n. 4, p.719-39, set. 2005.
- ASSIS, S. A.; MARTINS, A. G.; OLIVEIRA, O. M. M. de F. Purification and characterization of pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 87, n. 10, p. 1845-1849, maio 2007.
- BALL, S. G.; MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual Review of Plant Biology**, Palo alto, v. 54, p. 207-233, 2003.
- BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A.; COSTA E SOUZA, J. M. (eds). **Savanas de Roraima: Etnoecologia, Biodiversidade e potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. 202 p.
- BARROS LOPES de, M. et al. PCR differentiation of commercial yeasts strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 62, p.4514-4520, 1996.
- BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 326-338, 2001.
- BENEDETTI, U. G. **Estudo detalhado dos solos do Campus do Cauamé da UFRR, Boa Vista, Roraima**. 2007. 103 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2007.
- BENEDETTI, U. G. et al. Gênese, química e mineralogia de solos derivados de sedimentos pliopleistocênicos e de rochas vulcânicas básicas em Roraima, Norte Amazônico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo [online]**, Viçosa, v. 35, n. 2, p.299-312, mar./abr. 2011.
- BOTHA, A. Yeast in soil. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (eds). **The handbook Biodiversity e Ecophysiology of yeast**. New York: Springer, 2006. p. 222-240.
- BRIZZIO, S. et al. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 53, n. 4, p. 519-525, abr. 2007.
- BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

- BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresour Technology**, Porto Alegre, v. 101, n. 1, p. 268-275, jan. 2010.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, nov. 2002.
- CARDOSO, E. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade brasileira de ciências do solo, 1992. p. 33-39.
- CARVALHO, J. C. C., et al. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementados com complexos enzimáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 292-298, fev. 2009.
- CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p.75-80, jan./fev. 2003.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; SANTOS, T. M. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], n. 8, v. 22, p. 881-885, ago. 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 29, p.3-23, 2005.
- COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, [s.l.], v. 22, p. 299, 1987.
- FARIHA HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases – Review. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 31, p. 4836-4844, ago. 2010.
- FEITOSA, I. C. et al. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 27-31, jan./mar. 2010.
- FELL, J. W. Rapid identification of yeast species using three primers in polymerase chain reaction. **Molecular Marine Biology and Biotechnology (JournalSeek)**, New Jersey, v.2, n.3, p.174-180, 1993.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.
- FUENTEFRIA, A. M. ; VALENTE, Patrícia . Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of Hibiscus rosa-sinensis in Brazil. **Tecnológica**, [s.l.], v. 9, p. 9-25, 2005.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 74, n. 6, p. 621-634, mar. 1997.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. Optimization of cultivation conditions for extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using response surface method. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 17, p. 2270-2278, abr. 2013.

GOPINATH. S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich Environments. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 119-126, abr. 2005.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 01 set. 2012.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, jun. 2006.

IBGE. **Dados Geográficos do Estado de Roraima – censo 2010**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rr#/>. Acesso em: 10 fev. 2011.](http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rr#/)

IBGE. Projeto Levantamento e classificação da cobertura e uso da terra. Potencial florestal do Estado de Roraima. **Relatório técnico**. Rio de Janeiro, 2005. 25p.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Biodiversidade. **Geoambientes e Paisagens do Parque Nacional do Viruá – RR. Zoneamento Preliminar**. Boa Vista, 2009. 59 p.

INMET. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Climatologia-Mapas de condições registradas (abril e novembro/2011)**. 2011. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php>>. Acesso em: 17 mar. 2012.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 390-397, ago. 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JOO, A. R. et al. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s.l.], v. 83, p. 285-294, 2009.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 345-351, ago. 2002.

KRISHNA, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 69, p.231-239, 1999.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 411-456, jul. 1999.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 847 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5.ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 3, 761 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**, [s.l.], v. 73, p. 331-371, 1998.

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

MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S. B. **Padronização do uso de corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas**. Brasília: EMBRAPA, 2010. 3p. (Série Comunicado Técnico 05).

MACRAE, E. et al. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 314-323, 1992.

MAUTONE, J. L. et al. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 169-173, abr./jun. 2010.

MOSS, G. P. **Enzyme Nomenclature**: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

O'DONNELL, K. Fusarium and its near relatives. In: REYNOLDS, D.R.; TAYLOR, J.W. (Eds.). **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 225-233.

OLIVEIRA, R. Q., et al. Produção de pectinases por leveduras: uma revisão. **Sítientibus. Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v.9, p.41-47, jan./mar. 2009.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. Ecology. In: **The life of yeasts**. PHAFF, H. J.; MRAK, E. M. (eds). Cambridge: Harvard University Press, 1966. p.93-123.

PINHEIRO, T. L. F. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

PPBio. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. **Núcleos Regionais**. 2012. Disponível em: < <http://ppbio.inpa.gov.br/nregionais> >. Acesso em: 12 ago. 2012.

PPBIO. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. **Informações sobre o ppbio**. 2005. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/doc/documentos/docbasico/>>. Acesso em: 01 nov. 2011.

PPBIO. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. **Informações sobre o Campus experimental Cauamé-RR**. 2007. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/nrrr/cauame/>>. Acesso em: 08 nov. 2011.

PPBIO. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. **Informações sobre o Parque Nacional do Viruá-RR**. 2010. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/nrrr/virua/>>. Acesso em: 05 out 2011.

PPBIO. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. **Tamanho da Grade**. 2006. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/oldfolder/oldinventarios/grande/>>. Acesso em: 18 fev. 2011.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, set. 1998.

RAY, M. K. K. et al. Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 6, p.1918-1923, jun. 1992.

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

ROWELL, R. M. (Ed.). **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. CRC Press: Madison, 2005. 504 p.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 213-294, 1993.

SCORZETTI, G. et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribe spacer rDNA regions. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 495-517, jul. 2002.

SILVA NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**. [online], [s.l.], v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology [online]**, [s.l.], v. 41, p. 850-861, 2010.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, p. 382-385, 1998.

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, n. 1, p. 182-190, jul. 2001.

THAKUR, B R; SINGH, R.K. HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critic Revist Food Science Nutrition**, [s.l.], v. 37, n.1, p. 47-73, 1997.

TRINDADE, R. C., et al. *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 86, p. 27-32, 2004.

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VAN ELSAS, J. D.; SMALLA, K. Methods for sampling soil microbes. In: HURST, C. J. et al. (Ed.). **Manual of Environmental Microbiology**, Washington: ASM Press, 1997. p. 5-13.

VITAL, M. J. S et al. Leveduras micocinogênicas de solos da Estação Ecológica de Maracá, Roraima, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology [online]**, [s.l.], v.33, n.3, p.230-235, 2002.

VITAL; M. J. S.; ZILLI, J. E. Avanços em microbiologia do solo no estado de Roraima. In: BARBOSA, R. I.; MELO, V. F. **Roraima: Homem, Ambiente e Ecologia**. Boa vista: FEMACT, 2010. p. 409-429.

VITAL; M. J. S.; ZILLI, J. E. **Protocolo Básico de Coleta de Amostras de Solo para Caracterização da Diversidade Microbiana**. 2009. Disponível em: http://ppbio.inpa.gov.br/Port/docsinternos/apresentacoes/Nucleo%20de%20Roraima_form%2097-2003.pdf.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1998. 362 p.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, Washington D. C., v. 52, n. 3, p. 305-317, set. 1988.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 9-12.

ZARZOSO, B. et al. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, n. 2, p. 143-148, jun. 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 – Curva padrão para validação da solução II do teste de atividade lipolítica.

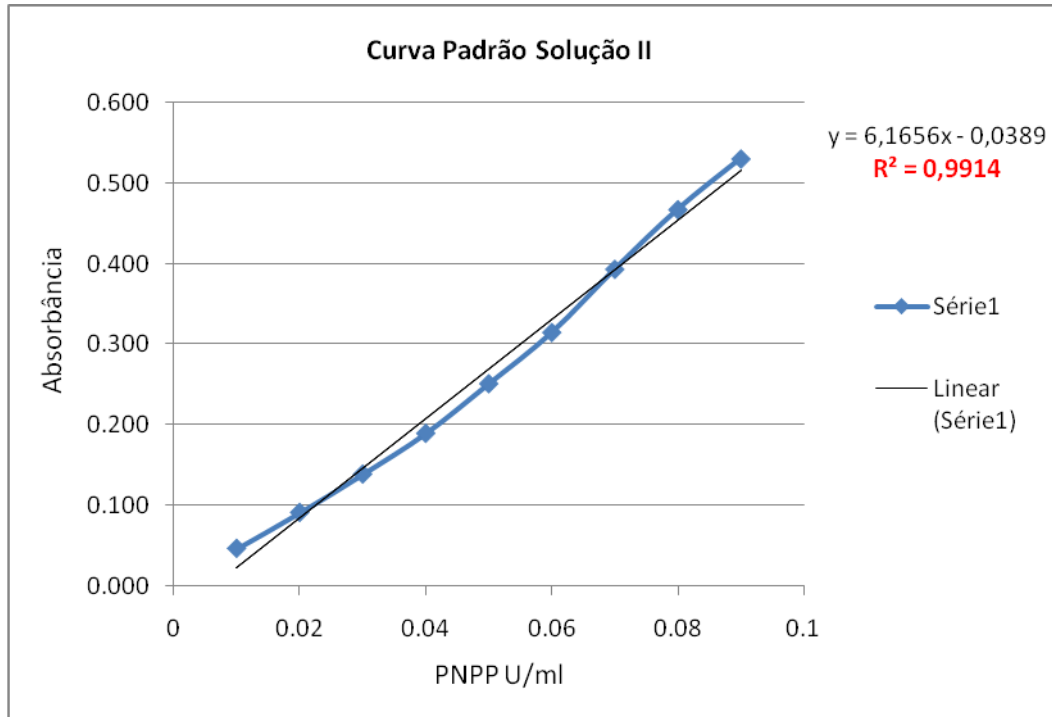


Tabela com os valores de absorbâncias da solução II do teste de atividade lipolítica.

PNPP	<u>Repetições</u>			Absorbância
	1	2	3	
0,01	0,045	0,048	0,047	0,047
0,02	0,09	0,094	0,09	0,091
0,03	0,137	0,14	0,14	0,139
0,04	0,185	0,192	0,192	0,190
0,05	0,247	0,258	0,249	0,251
0,06	0,31	0,31	0,32	0,315
0,07	0,393	0,394	0,393	0,394
0,08	0,463	0,468	0,472	0,468
0,09	0,538	0,538	0,516	0,531

ANEXO 2 – Sequência dos segmentos D1/D2 do gene 26S dos isolados.

VR520 = *Cryptococcus podzolicus*

AF075481.1|AF075481 *Cryptococcus podzolicus* 26S ribosomal RNA gene, partial
sequence

Length=628

Score = 1042 bits (564), Expect = 0.0

Identities = 577/583 (99%), Gaps = 1/583 (0%)

Strand=Plus/Plus

GGGCGGGTCTACAATCAATACCACGCAAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAATTTGAA
AGCTGGCGTCCTACGGGCGTCCGCATTGTAATCTATAGAGGGCGTTTTCTGTGCT
GGACCGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTA
CTTGACACGACAACCAGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG
ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGA
GTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATGGAGGTCAGTCGTGTCTG
TGGGATTCAGCCGTCTCTGGCGGTGTA CTTCCCACAGACGGGTCAACATCAGTT
TTGGCTGGCGGATAAAGGCAGGAGGAAGGTGGCACCCCGGGTGTGTTATAGC
CTCTTGTTGCATACGCTGGCTGAGACTGAGGAATGCAGCTCGCCTTTATGGCCG
GGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCCTTCAACGACCCG
TCTTGAACCACGGACCACTGCCTCCCATTTAGCGAAGGAAAAGTGCGTCTCTCT
TTTAATATAAGAACCACAGCATTTTTTTTTTTATAAAAAAAAAAAGAACTTTTTTTTTT
AAAAAAAAAAAAAACTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAATCCTTTTTTTTTTTATGAAA
AGAGAGAGGACTTTTTTTTATAGAGAGAGACTTC

VR533 = espécie nova, colocar *Candida* sp.

AF294910.1 | *Candida bituminiphila* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=604

Score = 719 bits (389), Expect = 0.0

Identities = 505/561 (90%), Gaps = 8/561 (1%)

Strand=Plus/Plus

```
CGCCTCTCAGGGCCCTCAGATACCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTG
AAATCTGGTACTTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGTAACTTTGGATTTGG
TCTTTGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGT
GGTGAAGATCCCATTTCTTGTAAGTGCTTTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTG
AAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAAATCAGACTTGATGTTTT
ATGATCAACTGTCTCTTGGGACTGTGCACTCATTTTTTCATCAGGCCAACATCGGT
TTAGATGGTGGGATAAAAGTTTAAGAATGTGGCTCCTCGGAGTGTTATAGCTTAGA
TTAATACCACCTATCTGGACCGAGGACCGCGCCTTTTGGCTAGGATGTTGGCGTA
ATGGTTTTAAGCCACCCGTCTAACCCCGGGGCCCCCAAGGGTCTTGGTTTGAA
AACACAGACCACAAACGGTTCGGAGAAGCCCACCATTACATTTTTCAACATAAAA
CAATATTGGCCTGATGAAAAGGAGTGCCGTCCAGAGACGTTGATCATAACATCA
GTCTGATTCAGCCTTCTTTTCACATTCAGGTACTTTTCACTCTCTTTCAAAGTTATT
CACTTCTCACGTCTTGTCTATGGATCTGCCAATTTAGCTCTAATAAAAGTCACCC
CTTAAACTGCATCAAACAATCGCCCCTTTTA
```

VR535 = *Cryptococcus podzolicus*.

AF075481.1|AF075481 *Cryptococcus podzolicus* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=628

Score = 1044 bits (565), Expect = 0.0

Identities = 578/584 (99%), Gaps = 2/584 (0%)

Strand=Plus/Plus

AGGGGGGTTGCGGTCACACCCGCTCGCAGCGAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGA
AAGCTGGCGTCCTACGGGCGTCCGCATTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCTGTGCT
GGACCGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTA
CTTGACACGACAACCAGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG
ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGA
GTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATGGAGGTCAGTCGTGTCTG
TGGGATTCAGCCGTCTCTGGCGGTGTACTIONCCACAGACGGGTCAACATCAGTT
TTGGCTGGCGGATAAAGGCAGGAGGAAGGTGGCACCCCCGGGTGTGTTATAGC
CTCTTGTTGCATACGCTGGCTGAGACTGAGGAATGCAGCTCGCCTTTATGGCCG
GGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCCTTCAACGACCCG
TCTTGAAACCACGGACCACTGCATACCTTTTTTGCAGGAAAGCATTCTGTCTTT
TTTTTTAAAAAAAAAAAAACATTTTTTTTTTTAAGAAAAAAAAAAATCTTTTTTTTTTTTT
AAAAAAAAACACGTTTTTTTTTTGTATAAAAAAATACTTTTCTTTTTATGAGGAG
CAGACGCTCTCTATTTCATATAGAGAGAGAGCTGTCTGTTATACAAAAGAGAGTCG
TGTGCGTATAGAGTACAT

VR543= *Rhodotorula mucilaginosa*

FJ874772.1 | *Rhodotorula mucilaginosa* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=573

Score = 994 bits (538), Expect = 0.0

Identities = 556/564 (99%), Gaps = 3/564 (1%)

Strand=Plus/Plus

```
GGACGGGTACGCAACGCAGCACGCGCGGAGCGGGAGAGCTCAAATTTATAAT
CTGGCACCTTCGGTGTCTGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACC
GCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCCGTATATGGT
GCGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT
GCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG
ATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTA
ACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGA
GCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGA
AGGTAGCAGTTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTG
AGGAACGCAGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCT
GGTGGAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAAACCACGGACCACTGCCGCTCATT
TTTCAAAGGAGAACATTTTCCTCTTTTTTTTTTAAAAAATAATTTTTTTTTTTTA
AAAAAAAAAAACAAAATTTCTTTTTTTTTTAAAAAAGAAAAAACTTTTTTCTTTTTATT
AAAAAAAAAATAGCGTTTTTTTTTTTTTAAAAAGGAAAGACGTCTTGTTTCTTGAAGAG
AAAACGCGACTTCTCATTTGAGACGATAGAGACTGTCT
```

VR544 = *Candida pseudointermedia*

U44816.1|CPU44816 *Candida pseudointermedia* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=518

Score = 856 bits (463), Expect = 0.0

Identities = 470/473 (99%), Gaps = 2/473 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
GGCCGTTAGGCAGAACTACACTGCGTGTGCGGCAGGCTCAATTTGTATCCTTCG
GGAGTTGTAATTTGTAGGTTGGGAGACCCCGCGGCTAGTGGCACCAAGTCCCTT
GGAACAGGGCGCCTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGTACCACAACACCGTCTT
GTGTCTCCTCTCCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGG
TAAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGT
GATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAATTGTT
GAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGCCTTCGTGCCGGGCCAGCATCGG
TTGCTAGGGGTGGATAAGGAACAAGGAATGTAGCTCCTCGGAGTATTATAGCCTT
GCGCGATACACCCACTGGCGACCGAGGCCTGCGGTATTCCTACCTAGGATGCTG
GCGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCACTGCATATCAATAA
GAGGCGGAAAAACAGCCCCTCTTCTTGAAAAAAAAAAAAACCACCTCTTTTTAAAA
AAAAAAAAAACACTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAACCTTTTTTTTTTTTTAAAA
AAAAAAAAAGACGTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAACACATTTCTTTTTTTAGAAAAGA
AAAGATATTTTTTTTTTTTTTAAACAAAAAAGGCTCTTCCGGCGGAGA
```

VR545 = *C. pseudointermedia*

U44816.1|CPU44816 *Candida pseudointermedia* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=518

Score = 907 bits (491), Expect = 0.0

Identities = 500/504 (99%), Gaps = 2/504 (0%)

Strand=Plus/Plus

ACCCCTAATGCCTCGCTACGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCC
TTCGGGAGTTGTAATTTGTAGGTTGGGAGACCCCGCGGCTAGTGGCACCAAGTC
CCTTGGAACAGGGCGCCTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGTACCACAACACCG
TCTTGTGTCTCCTCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGG
GTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
CAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGCCTTCGTGCCGGGCCAGCAT
CGGTTGCTAGGGGTGGATAAGGAACAAGGAATGTAGCTCCTCGGAGTATTATAGC
CTTGCGCGATACACCCACTGGCGACCGAGGCCTGCGGTATTCCTACCTAGGATG
CTGGCGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTGAAAACAAGGGGAACCCCCAGGC
CCCCTTTTTAAAAACAGGCACACAATTGGTTTTTTTTTTAAAAACAAAAAAAATT
T

VR546 = *Yarrowia* sp., especie nova

AY789654.1 | *Candida hispaniensis* isolate NRRL Y-5580 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=533

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0

Identities = 494/507 (97%), Gaps = 2/507 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
AGCGTTCTTGCCAACAATACACGCGCAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAA
GCTTCGGCATTGTAATTTGAAGACTTGGCATTGGGATAAAGCTAACCCAAGTTGC
TTGGAACAGCACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTATGGCTAACCGTTATCCTAT
GTATTGCCTTGTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAACTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTG
AAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTATGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGGGAAAAATTGGAGGCATGCCTTAGGGTTCACTTCTGTTTCGGCAG
GAGGTACTCCCGACGGCGGGTCATCCAGGGGGATTACCGCAGGATAAACGGCT
TGGAATTGCTTGCAAGGCCTTGTCACCTACTGCGTGTAGCTCCTTTGGCTGACG
TAATCCAATTTCTCCACCCGTCTTGAAACACGGGACCACTGCGTCTCATTATGAA
GAGGAAAACACCCCCTCTTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTTTTTTTTTTAAAAAA
AAAAAAAAACCCTCTTTTTTTTTTAGAAAAAAAAAGCATTTTTTTTTTTTTTTTGAAAAAA
AAAAAATTTTTTTTTTTTTATAAAAAAAAAAACTTATTGTTTTTATTAAAAAAAAAAAGAC
GTGTTTATTTTGGGTAGAAGGACGAGACCGCCTTGGTATGGAGAAAAA
```

VR547 = *Yarrowia* sp., espécie nova

AY789654.1 | *Candida hispaniensis* isolate NRRL Y-5580 26S ribosomal RNA gene,
partial sequence

Length=533

Score = 859 bits (465), Expect = 0.0

Identities = 493/506 (97%), Gaps = 3/506 (1%)

Strand=Plus/Plus

CGGGGGGGGAAGCCAAAACCTACAGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAATTTGA
AAGCTTCGGCATTGTAATTTGAAGACTTGGCATTGGGATAAAGCTAACCCAAGTT
GCTTGGAACAGCACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTATGGCTAACCGTTATCC
TATGTATTGCCTTGTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGT
GGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACT
GTGAAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTATGTGAAATTG
TTGAAAGGGAAGGGAAAAATTGGAGGCATGCCTTAGGGTTCACTTCTGTTTCGG
CAGGAGGTACTCCCGACGGCGGGTCATCCAGGGGGATTACCGCAGGATAAACG
GCTTGGAATTGCTTGCAAGGCCTTGTCACCTACTGCGTGTAGCTCCTTTGGCTG
ACGTAATCCAATTTCTCCACCCGTCTTGAGCACGGACCACTGCAGATCAATAAGA
AGAGGAAAACAATCCTTCTTCTTAAAAAGAAAACAACCCCTCTTTTTAAAAAAA
AAAAAAAACCTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAAA
GAACCTTTTTTTTTTTTTAAAAAAGAAATATATTGTTTTTTAGTGAAAAAAAATAG
AGGTTCTTTATGGAAGAAGAATGGTGCTTACATTATTAAAAAAACG

VR558 = *Cr. podzolicus*

|AF075481.1|AF075481 *Cryptococcus podzolicus* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=628

Score = 1029 bits (557), Expect = 0.0

Identities = 575/583 (99%), Gaps = 3/583 (1%)

Strand=Plus/Plus

TGCGGTTTGGAAACAAAATAGCACGCGAGCGCAGCGGGAGAGCTCAATTTGAAA
GCTGGCGTCCTACGGGCGTCCGCATTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCTGTGCTG
GACCGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTAC
TTGACACGACAACCAGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG
ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGA
GTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATGGAGGTCAGTCGTGTCTG
TGGGATTCAGCCGTCTCTGGCGGTGTACTTCCCACAGACGGGTCAACATCAGTT
TTGGCTGGCGGATAAAGGCAGGAGGAAGGTGGCACCCCCGGGTGTGTTATAGC
CTCTTGTTGCATACGCTGGCTGAGACTGAGGAATGCAGCTCGCCTTTATGGCCG
GGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCCTTCAACGACCGT
CTTGAACAAGGGAACAACACTGCTGTTTTTTTTTTGAAGGAAAGATATGTCTTGTTT
TTATTATTAATAAAGAAACATTTTTTTTTTATAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTA
AAAAAAAAAGATCTTTTTTTTTTTTAAAAAGAGAGAGTCTTTTTTTTTTTGACAGA
TAAAGGTCTCGATTTTGAGAGACAGAGAGATGCTCTTTTCGAGTGGAGAGATGG
ACGTAGGTAGTGTGG

VR571 – *Yarrowia* sp., espécie nova.

AY789654.1 | *Candida hispaniensis* isolate NRRL Y-5580 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=533

Score = 859 bits (465), Expect = 0.0

Identities = 496/510 (97%), Gaps = 5/510 (1%)

Strand=Plus/Plus

AGGGGTTTGCCGTTGCTACTGCGCGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAAGCTT
 CGGCATTGTAATTTGAAGACTTGGCATTGGGATAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGG
 AACAGCACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTATGGCTAACCGTTATCCTATGTAT
 TGCCTTGTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAA
 CTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAG
 GAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTATGTGAAATTGTTGAAA
 GGGAAGGGAAAAATTGGAGGCATGCCTTAGGGTTCACTTCTGTTTTCGGCAGGAG
 GTACTCCCGACGGCGGGTCATCCAGGGGGATTACCGCAGGATAAACGGCTTGG
 AATTGCTTGCAAGGCCTTGTACCTACTGCGTGTAGCTCCTTTGGCTGACGTAAT
 CCAATTTCTCCACCCGTCTTGAACCACGGACCACTGAAGCTCATTATAAGAGGA
 AAACAACCCCTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAACAACCCTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAA
 AAAAAATCTTTTTTTTTTATAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTATAAAAAAAAAAA
 AATCCCTTTTTTTTTTGAGAAAGAAAAGAAGGGGTGTTGTTGGTGGAGGTGGAGG
 GCTAGTTCGGTT

VR572 - *Yarrowia* sp., espécie nova.

AY789654.1 | *Candida hispaniensis* isolate NRRL Y-5580 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=533

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0

Identities = 505/522 (97%), Gaps = 7/522 (1%)

Strand=Plus/Plus

AGGGTTTTGCCATAATACTGCGCGTGAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAAGCTTCG
GCATTGTAATTTGAAGACTTGGCATTGGGATAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGGAA
CAGCACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTATGGCTAACCGTTATCCTATGTATTG
CCTTGTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACT
CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGA
AAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTATGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGAAAATTGGAGGCATGCCTTAGGGTTCACTTCTGTTTCGGCAGGAGGT
ACTCCCGACGGCGGGTCATCCAGGGGGATTACCGCAGGATAAACGGCTTGGAA
TTGCTTGCAAGGCCTTGTCACCTACTGCGTGTAGCTCCTTTGGCTGACGTAATCC
AATTTCTCCACCCGTCTTGAAACAACGGGACCACTGCCGCCCATTTTTTAAAAGGA
AAAAACCTCCTCTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAACTTTCTTCTTTTTTAAAAAAAAAA
AAAACCTTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAT
TTTCTTTTTTTTTGTGAAAAAGAAGAGATCTGGTGGGGGGGTGGAGAAGACGCC
AGGGTTGTTATCGAAGAAGGAGGAGAGCATAGATATGCTAAAACGGAGAAGGGA
GAGAGGATCGAAAGAGCAACCAGCGCCTGAGGGAAAGAGAGCGAGCCTTTGTA
TCGG