



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA
FILOSFERA DA PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO
(*Baccharis dracunculifolia* DC – Asteraceae)**

Londrina
2015

GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA
FILOSFERA DA PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO
(*Baccharis dracunculifolia* DC – Asteraceae)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P436i Pereira, Gilberto de Aguiar.

Isolamento, identificação e caracterização do potencial enzimático de leveduras da filosfera da planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC-Asteraceae) / Gilberto de Aguiar Pereira. – Londrina, 2015.
50 f. : il.

Orientador: Fernando Gomes
Barcellos. Coorientador: Elisete Pains
Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Leveduras (Fungos) – Teses. 2. Enzimas de fungos – Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. 4. Compostas – Teses. I. Barcellos, Fernando Gomes. II. Rodrigues, Elisete Pains. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 582.282.23

GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO
POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA FILOSFERA DA
PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis
dracunculifolia* DC – Asteraceae)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes
Barcellos.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Juliana Silveira do Valle
Universidade Paranaense – UNIPAR/Umuarama

Prof.^a Dr.^a Gislayne Trindade Vilas Bôas.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de março de 2015.

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade.

Aos professores: Dr.^a Elisete Pains Rodrigues e Dr. Fernando Gomes Barcelllos pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos estagiários: Amanda Machado Rozolem, Bruno Henrique Gonçalves de Aguiar Milhim, Giovana de Oliveira Gutuzzo, Giovanna Capello Batista, Guilherme Teixeira Gomes e Renan Cantanti Marques pela cooperação.

Ao técnico do Laboratório de Genética de Micro-Organismos: Ideval Azarias de Souza pela colaboração.

A Dr.^a Jakeline Renata Marçon Delamuta e ao Dr. Renan Augusto Ribeiro pela ajuda com as reações de sequenciamento.

A pesquisadora Dr.^a Mariangela Hungria da Cunha pelos materiais e equipamentos cedidos.

A professora Dr.^a Fabiana Guillen Moreira Gasparin pela assessoria nas reações de quantificação da atividade lipolítica.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

PEREIRA, Gilberto de Aguiar. **Isolamento, identificação e caracterização do potencial enzimático de leveduras da filosfera da planta medicinalalecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae)** 2015. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Plantas são consideradas ambientes promissores para encontrar micro-organismos com potenciais aplicações biotecnológicas. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) uma planta medicinal de reconhecida importância na produção do própolis verde, foi a planta selecionada para a realização deste estudo, cujos objetivos foram: isolar, identificar e avaliar a produção de enzimas hidrolíticas obtidas a partir de fungos leveduriformes associadas à *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae). Para isso após o isolamento em meio sólido BDA e TSA, os fungos leveduriformes que colonizam as flores, foram caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente com base na análise da sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Adicionalmente a atividade amilolítica, celulolítica, pectinolítica, proteolítica e lipolítica foram testadas em meio sólido contendo amido, caseína, carboximetilcelulose (CMC), pectina e Tween 80 como substrato, respectivamente. Os 28 isolados de fungos leveduriformes obtidos foram agrupados em quatro morfotipos com base na morfologia de suas colônias e identificados como pertencendo aos gêneros *Aureobasidium*, *Occultifur*, *Rhodotorulla* e *Starmerella*. A maioria dos isolados apresentou atividade para todas as enzimas testadas, no entanto, a atividade lipolítica foi a mais prevalente (95%), por isso, ensaios quantitativos conduzidos com 3 isolados de *Aureobasidium pullulans* demonstraram uma atividade lipolítica expressiva (3,4-4,7 U/mL). Em conclusão, os resultados revelaram que a as flores da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) são colonizadas predominantemente por leveduras do gênero *Aureobasidium* e que este segmento vegetal é um habitat promissor para leveduras produtoras de uma grande variedade de enzimas, especialmente as lipolíticas.

Palavras-chave: Leveduras. Planta Medicinal. Enzimas. *Aureobasidium*. Asteraceae.

PEREIRA, Gilberto de Aguiar. **Isolation, identification and characterization of the enzyme potential of yeast isolated from the phyllosphere of the plant alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae)** 2015. 50p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

Medicinal plants are considered promising habitats to find biotechnological relevant microorganisms. *Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae (alecrim-do-campo), a medicinal plant of recognized importance for green propolis production, was the target of this study, which aimed to isolate, identify and evaluate the production of hydrolytic enzymes of yeasts associated to *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae). Yeasts that colonize the flowers were isolated in solid medium BDA and TSA. Morphological characterization and molecular identification based on sequence analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA were performed. The amylolytic, cellulolytic, pectinolytic, proteolytic and lipolytic activities were tested on solid media containing starch, casein, carboxymethylcellulose (CMC), pectin or tween 80 as substrate, respectively. 28 yeast isolates were obtained. Based on the colony morphology, the isolates were grouped into four morphotypes. Most isolates obtained presented black colonies in BDA medium. By analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence, isolates were identified as members of four different genera: *Aureobasidium*, *Occultifur*, *Rhodotorulla* and *Starmerella*. Most of the isolates were versatile and showed the enzymatic activity tested, however, the lipolytic activity was observed to be the most prevalent (95%) among the isolates. Three isolates of *A. pullulans* were chosen for quantification of lipase production. A high lipase activity was observed (3.4 to 4.7 U/mL) by isolates. In conclusion, our findings revealed that flowers *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) are colonized predominantly by yeasts of *Aureobasidium* genus and that this plant is a promising habitat of yeasts producers of a large variety of extracellular enzymes, mainly for production of lipase.

Keywords: Yeasts. Medicinal Plant. Enzyme. *Aureobasidium*. Asteraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alecrim-do-campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC - Asteraceae).....	14
Figura 2 - Caule, folhas e flores de <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae).....	15
Figura 3 - Filosfera: Interações entre planta e micro-organismos.....	18
Figura 4 - Ocorrência de isolados de leveduras associadas a planta medicinal <i>Baccharis dracunculifolia</i> D.C (Asteraceae) de acordo com os morfotipos.	35
Figura 5 - Macro e micromorfologia de isolados de leveduras representantes dos seus morfotipos, obtidos a partir da planta medicinal <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae).	36
Figura 6 – Árvore filogenética construída pelo método de <i>neighbor-joining</i> e baseada na sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de leveduras isoladas da planta medicinal <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae). Os números entre nós indicam os valores de bootstrap (%) com base em 1.000 repetições. A barra de escala corresponde a 0,2 substituições por posição de nucleótido. Os números entre parênteses indicam os números de acesso no <i>Genbank</i> . A levedura <i>Sympodiomyces attinorum</i> foi usada como <i>outgroup</i>	38
Figura 7 - Perfil de atividade enzimática de isolados de leveduras isoladas a partir da planta medicinal <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae).....	39
Figura 8 – Produção de lipase em meio líquido.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações das principais enzimas derivadas de leveduras	19
Tabela 2 - Identificação taxonômica (gênero e espécie) de leveduras isoladas a partir da planta medicinal <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae) com base nos níveis de similaridade encontrado da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com sequências do rDNA provenientes de isolados de leveduras existentes no banco de dados <i>GenBank</i>	37
Tabela 3 – Análise semi-quantitativa da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares realizadas a partir do cálculo do índice enzimático (IE).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
g/L	grama por litro
ITS 1 e 4	Internal Transcribed Spacer 1 e 4
M	Molar
mM	milimolar
nm	nanômetros
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RPM	Rotação Por Minuto
TBE	Tris-Borato-EDTA
U/mg	Unidade por miligrama
U/mL	Unidade por mililitro
V/cm	Volts por centímetro
YPD	Yeast-Peptone-Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	MICRO-ORGANISMOS E PLANTAS	12
2.2	LEVEDURAS, FILOSFERA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS	16
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	ARTIGO	
	ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA FILOSFERA DA PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO (<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC - Asteraceae).....	22
4.1	RESUMO.....	22
4.2	INTRODUÇÃO	24
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.3.1	Material vegetal e Isolamento.....	25
4.3.2	Caracterização morfológica e molecular	26
4.3.3	Testes de atividade enzimática extracelular	27
4.3.4	Quantificação da atividade lipolítica	28
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.4.1	Isolamento e identificação molecular de leveduras	29
4.4.2	Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares	31
4.5	CONCLUSÃO.....	34
4.6	AGRADECIMENTOS	34
4.7	TABELAS E FIGURAS	35
4.8	REFERÊNCIAS	42
5	REFERÊNCIAS GERAIS	48

1 INTRODUÇÃO

A superfície de folhas, flores e frutos (filosfera) de plantas sem relevância agrícola são ambientes altamente negligenciados por investigações microbiológicas. Condições nutricionais limitadas e características únicas da filosfera, permitem sua colonização por grupos específicos de micro-organismos, sendo considerada fonte importante de estudos que contribuam para o conhecimento da diversidade microbiana local e para a descoberta de novos produtos de interesse biotecnológico.

A planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae) foi selecionada para a realização desta investigação, por ser amplamente utilizada na medicina popular para combater problemas hepáticos e disfunções estomacais e por possuir diversas outras atividades biológicas (SFORCIN et al., 2012), características fortemente desejáveis segundo Strobel e Daisy (2003) que destacam em seu trabalho que os conhecimentos etnobotânicos ou conhecimentos tradicionais associados sejam uma das justificativas para a seleção de uma fonte vegetal para estudos microbiológicos.

Por todo o potencial biotecnológico associado e ainda por colonizar diversos nichos, incluindo a filosfera, os fungos leveduriformes, foram os micro-organismos escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho, que avaliou ainda qualitativamente e quantitativamente a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares empregadas em vários processos industriais (no processamento de alimentos, na fabricação de ração animal, fabricação de medicamentos e cosméticos, na indústria têxtil, de papel e celulose, bem como na pesquisa) (PEREIRA JR; BON; FERRARA, 2008). Investigações como esta se fazem necessárias e são significativas, pois podem contribuir para com a descoberta de enzimas com características únicas que poderão se tornar alternativas às já disponíveis no mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICRO-ORGANISMOS E PLANTAS

Ao contrário dos outros organismos, os micro-organismos ocupam todos os nichos bióticos e abióticos do planeta Terra (GUNATILAKA, 2006), por este motivo possuem uma grande adaptabilidade genética e uma extensa diversidade metabólica, tornando-os assim uma importante fonte de recursos para os avanços da biotecnologia (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Contudo, apesar da reconhecida importância ecológica na manutenção da vida e sua utilização em processos biológicos úteis para o homem, a maioria das espécies de micro-organismos é ainda desconhecida, com uma estimativa de que menos de 5% das espécies de fungos e 1% das espécies de bactérias estejam descritas (YOUNG, 1997).

Os micro-organismos, podem ser encontrados em associação com outros organismos vivos, como animais e plantas. Dentre as diversas interações que os micro-organismos realizam com outros organismos vivos, atualmente tem sido crescente o interesse pelas associações que eles mantêm com as plantas; com elas, os micro-organismos estabelecem diversas interações intraespecíficas, benéficas ou patogênicas, numa grande diversidade de habitats como a endosfera, a filosfera e a rizosfera (MONTESINOS, 2003). Entretanto, apesar da grande diversidade de interações e de micro-organismos, o estudo microbiológico com espécies vegetais tropicais é ainda muito restrito. A maioria dos estudos sobre a interação planta-micro-organismo restringe-se a poucas espécies vegetais, principalmente plantas de interesse agrícola ou a alguns grupos de bactérias e fungos filamentosos. Considerando então a diversidade de leveduras associadas às plantas, o conhecimento é ainda mais limitado.

O Brasil abriga cerca de 20% de todas as espécies de plantas do planeta (BERLINCK, 2012). Contudo, a falta de preservação pode levar a extinção de algumas dessas espécies, o que é preocupante, especialmente porque algumas delas jamais poderão ser estudadas e características úteis à humanidade poderão ser perdidas se não forem identificadas. Levando em consideração a megadiversidade da flora brasileira e a possibilidade que em cada espécie vegetal

possa habitar ao menos um micro-organismo (STROBEL; DAISY, 2003), investigações microbiológicas em espécies nativas da flora local se tornam necessárias para se conhecer a diversidade destes micro-organismos.

Conforme Strobel e Daisy (2003), diversas plantas medicinais são fontes promissoras de novos e interessantes micro-organismos, muitos dos quais podem ter propriedades comuns às suas plantas hospedeiras. Neste sentido, o conhecimento etnobotânico ou tradicional, bem como o conhecimento fitoquímico sobre a espécie vegetal é um importante ponto de partida para a seleção de uma fonte vegetal para estudos bem sucedidos que visam encontrar micro-organismos com atividades biológicas de interesse biotecnológico.

A planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae); popularmente conhecida como alecrim-do-campo (Figura 1 e 2) pode ser caracterizada como uma planta arbustiva, dióica lenhosa e perene (GOMES; FERNANDES, 2002) que possui folhas membranáceas, lanceoladas e alternadas (BASSAN; SACCARDI, 2010), seu caule é altamente ramificado e densamente recoberto por tricomas (SANTOS et al., 2012) e apresentam inflorescências nas axilas das folhas, constituída por capítulos pedunculados, margeados por brácteas (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). É considerada uma planta invasora (MARCHESAN et al., 2006) que geralmente ocorre desde o sudeste até a região sul do Brasil e em países da América do Sul como Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia.

A planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) é utilizada pelo homem para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (BUDEL et al., 2004) e também como anticariogênico (LEITE, 2009); antinoceptivo (SANTOS et al., 2010); antioxidante e antimicrobiano (FABRI et al., 2011); fitorremediador (GILBERTI, 2012), como fragrâncias (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005) e ainda como quimioprotetor (MUNARI et al., 2010) e por abelhas (*Apis mellífera*) para a produção de própolis verde.

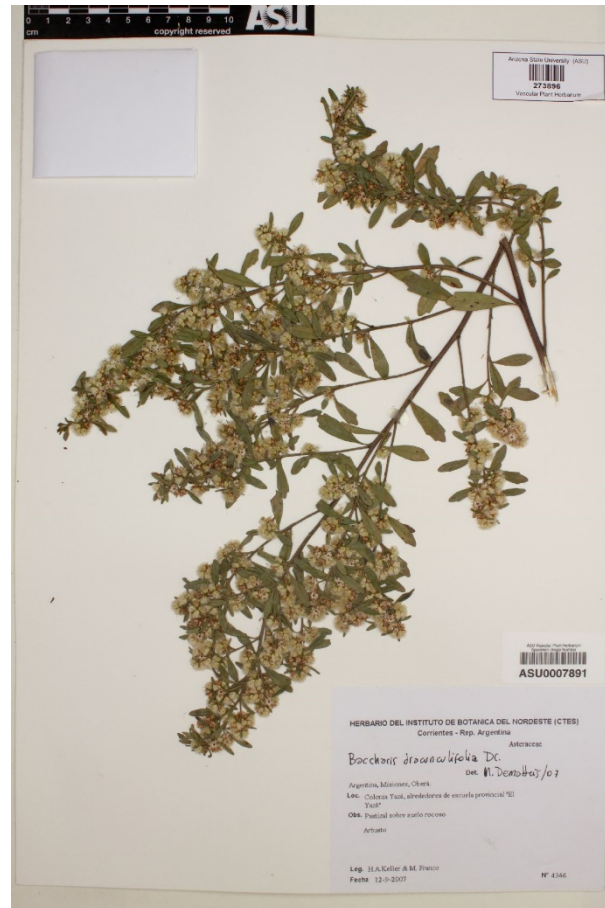
Figura 1 – Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae)



Fonte: Flora Santa Catarina (2015)¹

¹ Disponível em: <<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/asteraceae/baccharis-sp>> Acesso em: 10 de jan. 2015

Figura 2 - Caule, folhas e flores de *Bacharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)



Fonte: Herbario Virtual Austral Americano (2015)²

² Disponível em: < <http://www.herbariovaa.org/imagelib/imgdetails.php?imgid=3917> > Acesso em: 08 de jan. 2015

Estudos anteriores com a planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae), demonstram que a comunidade de fungos filamentosos nesta planta é muito estudada. Oki et al. (2009), identificaram dois gêneros de fungos filamentosos endofíticos: *Cladosporium* sp. e *Rhizoctonia* sp. entre os 8 micro-organismos que eles isolaram. Link e Onofre (2010) obtiveram 20 isolados de fungos filamentosos epífíticos que foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Cuzzi et al. (2012) isolaram 511 fungos filamentosos endofíticos, entre os quais havia o predomínio dos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. Com isso, podemos observar que a comunidade de fungos filamentosos nesta planta é diversificada, no entanto, estudos com os fungos leveduriformes, nunca foram realizadas.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para o estudo de leveduras. No caso da identificação taxonômica (gênero e espécie) busca-se a integração de metodologias que se baseiam na análise das características fenotípicas com as que utilizam características genotípicas. O desenvolvimento das metodologias moleculares de análise do DNA, principalmente aquelas com base no uso da PCR (reação em cadeia da polimerase) e das técnicas de sequenciamento do DNA, permitiram o estabelecimento de estratégias de identificação mais precisas de isolados microbianos (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010). Em fungos tem sido amplamente utilizada na identificação taxonômica (gênero e espécie) de isolados, tanto por análises de PCR-RFLP como pelo sequenciamento desta região e a comparação por similaridade com sequências ribossomais de linhagens fúngicas depositadas em bancos de dados públicos (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010).

2.2 LEVEDURAS, FILOSFERA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais corretas (MONTEIRO e SILVA, 2009). Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam ainda muito utilizadas, elas estão sujeitas à disponibilidade de terra e às flutuações das colheitas ou do abate, por isso, a tendência é substituí-las por outras de origem microbiana, (MALAJOVICH, 2011) até porque elas possibilitam a utilização de substratos baratos como os

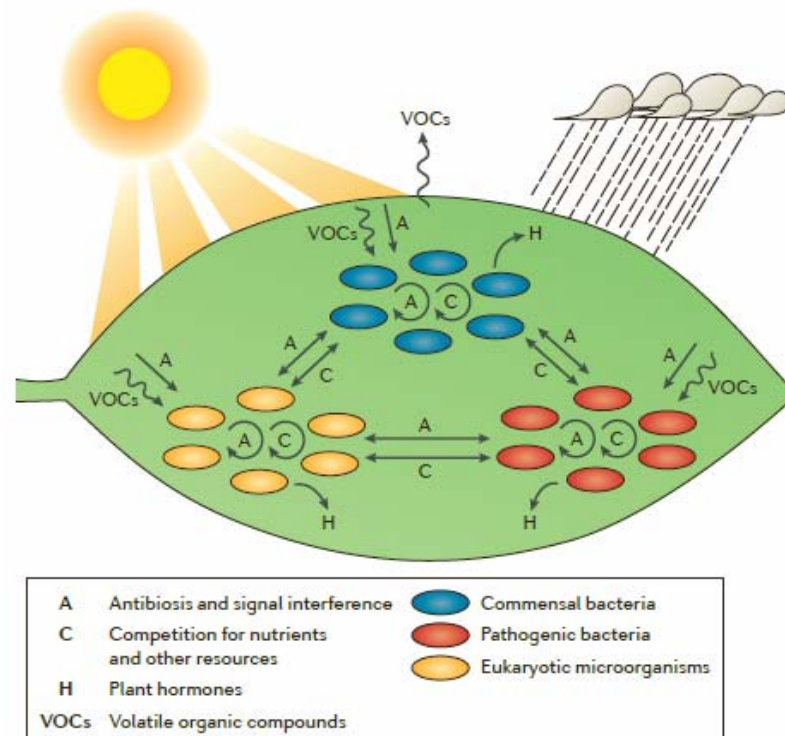
resíduos agrícolas e também porque o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos.

Vários processos industriais utilizam enzimas, dentre eles podemos incluir aplicações no processamento de alimentos, na fabricação de ração animal, fabricação de medicamentos e cosméticos, na indústria têxtil e de papel e celulose, bem como na pesquisa e desenvolvimento biotecnológico; um mercado pouco explorado e desenvolvido no Brasil (POLITZER; BON, 2006), mas que em escala mundial movimentou aproximadamente US \$ 4,8 bilhões em 2013 e onde se prevê que em 2018 esta movimentação supere a casa dos US \$ 7,0 bilhões (COMPANIES and MARKETS, 2015) configurando assim um mercado promissor inclusive no futuro.

Sendo assim, a busca por micro-organismos, em especial leveduras, nos mais variados habitats e a extensiva seleção de isolados pode levar a descoberta de enzimas com características únicas de interesse para aplicação biotecnológica. A obtenção destes micro-organismos pode ser feita de várias maneiras, tais como: isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de micro-organismos recombinantes por técnicas de engenharia genética entre outros (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O recurso natural filosfera (parte aérea superficial das plantas) foi selecionado para esta investigação, pois é um dos maiores habitats para micro-organismos no planeta Terra (aproximadamente 1,017,260,200 km²) (LINDOW; BRANDL, 2003); no entanto por se tratar de um ambiente inóspito, a sobrevivência dos micro-organismos neste local esta condicionada a sua adaptação aos períodos de seca, luz intensa, ao fluxo e refluxo de nutriente, à flutuação de pH, variação de temperatura, condições osmóticas, presença de compostos antimicrobianos entre outras condições; assim como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Filosfera: Interações entre planta e micro-organismos



Fonte: Vorholt, J. A. (2012)³

Diante então deste ambiente que apresenta várias condições desfavoráveis para o desenvolvimento dos micro-organismos, estratégias adaptativas tais como: produção de exopolissacarídeo, produção de pigmentos, sistemas de reparação do DNA, e produção de enzimas hidrolíticas foram estratégias desenvolvidas pelos micro-organismos habitantes da filosfera para sobreviver neste local. A produção de exopolissacarídeo ajuda os micro-organismos a reterem água; a produção de pigmentos atua como uma barreira física entre a luz solar e os micro-organismos. Os sistemas de reparação de DNA, atuam na reversão dos danos causados ao material genético dos micro-organismos (PUGH; BUCKLEY, 1971; LINDOW, 1991; MOODY et al., 1999; MORRIS, 2001) e a produção de enzimas hidrolíticas (quitinases, pectinases, lipases, etc); atuam no processo de lixiviação superficial dos tecidos da planta, garantindo aos micro-organismos, acesso mais facilitado aos nutrientes. (KINKEL, 1991; MORRIS, 2001).

³ VORHOLT, Julia A. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

A utilização de enzimas produzidas por fungos leveduriformes (leveduras) isolados a partir da filosfera, ainda não é frequente; no entanto, na Tabela 1 é possível observar que as enzimas provenientes de leveduras isoladas a partir de outras fontes, possuem diversas aplicações.

Tabela 1 - Aplicações das principais enzimas derivadas de leveduras

Enzimas	Leveduras	Aplicações
Celulase	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Dekkera intermedia</i> e <i>Kluyveromyces cellobiovorans</i>	Hidrólise da celulose e fermentação da celobiose
Fitase	<i>Ogataea polymorpha</i>	Hidrólise da ligação fósforo-proteína, removendo os efeitos proteolíticos negativos do ácido fítico e aumentando assim a digestão e absorção de proteína e aminoácidos
Inulinase	<i>Candida</i> spp. e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Hidrólise de levanas, produção de etanol e de xaropes com alta concentração de frutose
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de açúcar invertido
Lactase	<i>Candida pseudotropicalis</i> e <i>Kluyveromyces</i> spp.	Hidrólise da lactose do leite e seus resíduos em etanol e biomassa e ainda produção de leite adequado para indivíduos intolerantes à lactose
Lipase	<i>Candida rugosa</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Pseudozyma antarctica</i> <i>Trichosporon fermentum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Rhodotorula glutini</i>	Adjuvantes digestivos, modificadores de aroma, interesterificação de óleos, etc.
Quimosina	<i>Kluyveromyces</i> spp. e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Substituto do coalho na fabricação de queijos

Fonte: Walker (1998) e Johnson; Echavarri-Erasun (2011)

A produção de enzimas hidrolíticas é uma estratégia importante para que os micro-organismos se estabeleçam na superfície das plantas, por este motivo a filosfera é um local promissor para busca de leveduras que possuam atividades enzimáticas interessantes sob o ponto de vista biotecnológico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar, identificar e avaliar a produção de enzimas hidrolíticas obtidas a partir de fungos leveduriformes associadas à planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar leveduras obtidas a partir da filosfera da planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae);
- Constituir e organizar uma coleção de isolados destas leveduras;
- Identificar (gênero e espécie) os isolados obtidos pela amplificação e análise da sequência ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, comparando estas sequências com sequências de linhagens de referência ou tipo depositadas em bancos de dados públicos (ex. *GenBank*).
- Avaliar o potencial biotecnológico dos isolados da coleção quanto à atividade enzimática em diferentes substratos.
- Quantificar a atividade enzimática mais promissora para isolados selecionados.

4 ARTIGO

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA FILOSFERA DA PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae)

Gilberto de Aguiar Pereira^a, Guilherme Teixeira Gomes^a, Renan Cantanti Marques^a, Bruno de Aguiar Milhim^a, Giovana de Oliveira Gutuzzo^a, Fernando Gomes Barcellos^a, Elisete Pains Rodrigues^{a, *}

^aDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380 s/n, Caixa Postal: 10.011 - CEP: 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondências

Número de páginas de texto	18
Número de tabelas	02
Número de figuras	05

Endereço para correspondências:

Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 10.011
CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil
Telefone +55-4333714417
Fax +55-4333715828
e-mail: elisete@uel.br

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS DA FILOSFERA DA PLANTA MEDICINAL ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae)

Gilberto de Aguiar Pereira^a, Guilherme Teixeira Gomes^a, Renan Cantanti Marques^a, Bruno de Aguiar Milhim^a, Giovana de Oliveira Gutuzzo^a, Fernando Gomes Barcellos^a, Elisete Pains Rodrigues^{a, *}

^aDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380 s/n, Caixa Postal: 10.011 - CEP: 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

4.1 RESUMO

Plantas são consideradas ambientes promissores para encontrar micro-organismos com potenciais aplicações biotecnológicas. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) uma planta medicinal de reconhecida importância na produção do própolis verde, foi a planta selecionada para a realização deste estudo, cujos objetivos foram: isolar, identificar e avaliar a produção de enzimas hidrolíticas obtidas a partir de fungos leveduriformes associadas à *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae). Para isso após o isolamento em meio sólido BDA e TSA, os fungos leveduriformes que colonizam as flores, foram caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente com base na análise da sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Adicionalmente a atividade amilolítica, celulolítica, pectinolítica, proteolítica e lipolítica foram testadas em meio sólido contendo amido, caseína, carboximetilcelulose (CMC), pectina e Tween 80 como substrato, respectivamente. Os 28 isolados de fungos leveduriformes obtidos foram agrupados em quatro morfotipos com base na morfologia de suas colônias e identificados como pertencendo aos gêneros *Aureobasidium*, *Occultifur*, *Rhodotorulla* e *Starmerella*. A maioria dos isolados apresentou atividade para todas as enzimas testadas, no entanto, a atividade lipolítica foi a mais prevalente (95%), por isso, ensaios quantitativos conduzidos com 3 isolados de *Aureobasidium pullulans* demonstraram

uma atividade lipolítica expressiva (3,4-4,7 U/mL). Em conclusão, os resultados revelaram que as flores da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) são colonizadas predominantemente por leveduras do gênero *Aureobasidium* e que este segmento vegetal é um habitat promissor para leveduras produtoras de uma grande variedade de enzimas, especialmente as lipolíticas.

Palavras-chave: Leveduras. Planta Medicinal. Enzimas. *Aureobasidium*.
Asteraceae.

4.2 INTRODUÇÃO

A grande multiplicidade topográfica e microclimática da parte aérea superficial das plantas (filosfera) são características que favorecem o crescimento e desenvolvimento de diversos micro-organismos (ANDREWS; HARRIS, 2000). Com relação aos micro-organismos não patogênicos; sabe-se que esta comunidade geralmente é composta inicialmente por bactérias, que podem chegar a ser encontradas em densidades de até 10^7 células/cm² de folha (LINDOW; BRANDL, 2003); em seguida os fungos filamentosos, espécies dimórficas como *Aureobasidium pullulans*, e ainda várias outras leveduras aparecem para colonizar este habitat mais ativamente (FONSECA; INÁCIO, 2006).

Uma comunidade significativa de leveduras é abrigada pelas flores (FIDALGO-JIMÉNEZ et al., 2008). Last e Price (1969) estimaram que a ocorrência de leveduras poder chegar a 10^6 células por flor ou inflorescência, no entanto, por estarem expostas diretamente às intempéries as leveduras podem até mesmo não ocorrer.

Diante então, deste ambiente que apresenta várias condições desfavoráveis para o desenvolvimento dos micro-organismos, estratégias adaptativas tais como: produção de exopolissacarídeos, produção de pigmentos, sistemas de reparação do DNA, e produção de enzimas hidrolíticas foram estratégias desenvolvidas pelos micro-organismos habitantes da filosfera para sobreviver neste local. A produção de exopolissacarídeos ajuda os micro-organismos a reterem água; a produção de pigmentos atua como uma barreira física entre a luz solar e os micro-organismos. Os sistemas de reparação de DNA, atuam na reversão dos danos causados ao material genético dos micro-organismos (PUGH; BUCKLEY, 1971. LINDOW, 1991. MOODY et al., 1999. MORRIS, 2001) e a produção de enzimas hidrolíticas (quitinases, pectinases, lipases, etc); atuam no processo de lixiviação superficial dos tecidos da planta, garantindo aos micro-organismos, acesso mais facilitado aos nutrientes. (KINKEL, 1991. MORRIS, 2001).

O conhecimento etnobotânico ou tradicional, bem como o conhecimento fitoquímico sobre a espécie vegetal é um importante ponto de partida para a seleção de uma fonte vegetal para estudos bem sucedidos que visam encontrar micro-organismos com atividades biológicas de interesse biotecnológico (STROBEL;

DAISY, 2003). A planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) conhecida popularmente como alecrim-do-campo foi selecionada para a realização deste estudo, pois é amplamente utilizada pela medicina popular para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (BUDEL et al., 2004), por possuir várias outras propriedades biológicas já relatadas (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005. LEITE, 2009. MUNARI et al., 2010. SANTOS et al., 2010. FABRI et al., 2011. GILBERTI, 2012) e ainda porque ela é também utilizadas por abelhas (*Apis mellífera*) como uma das principais fontes para a produção de própolis verde (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

Diante de tudo o que já foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e avaliar a produção de enzimas hidrolíticas obtidas a partir de leveduras associadas à planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae).

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material vegetal e Isolamento

Amostras de *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) foram coletadas em uma área de ocorrência natural desta espécie na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no período de floração (Dezembro de 2011). Ramos de quatro plantas adultas (cerca de 2 m de altura) saudáveis foram coletados constituindo um “pool” que foi imediatamente processado no Laboratório de Genética de Micro-Organismos do Centro de Ciências Biológicas da UEL (CCB-UEL). Após separadas, as flores foram lavadas com água corrente e água destilada estéril.

Para o isolamento, dos micro-organismos, amostras de 1 g de flores foram suspensas em 9 mL de solução salina estéril (0.85%), a suspensão obtida foi diluída seriadamente até 10^{-5} . Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas nos meios ágar-batata-dextrose (BDA, Himedia) contendo 50 µg/mL de ampicilina e ágar triptona de soja (TSA, Himedia) contendo 50 µg/mL de ciclohexamida. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C por sete dias (ARAÚJO, 1998). Após esse período, as colônias foram contadas e expressas como

unidades formadoras de colônia por grama de material fresco (UFC/g material fresco). Colônias morfológicamente distintas foram repicadas para placas contendo BDA e TSA sem antibiótico até a obtenção de culturas puras. Os isolados foram preservados em meio sólido BDA inclinado e em glicerol 30% a -70 °C.

4.3.2 Caracterização morfológica e molecular

A caracterização dos isolados foi realizada a partir das características morfológicas das colônias cultivadas em meio BDA e pela observação de estruturas celulares no microscópio óptico (aumento de 100x). As colônias isoladas foram caracterizadas segundo: forma, tamanho, elevação, pigmentação, consistência e aspecto da borda conforme descrito por Kurtzman, Fell e Boekhout (2011). As colônias e estruturas celulares foram registradas em fotografias, a partir das quais alguns isolados foram selecionados para a caracterização molecular.

Para identificação molecular, colônias isoladas cultivadas por 3 dias em meio YPD (2% de peptona; 1% de extrato de levedura; 2% de glicose, 2% de ágar); foram ressuspensas em água destilada estéril (1 mL) e centrifugadas (4000 RCF por 5 min); o precipitado celular obtido, foi utilizado para a extração de DNA segundo Ausubel (2002). A concentração e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%) em tampão TBE (0,5x) a 5 V/cm (Sambrook, 2006). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta (U.V.) e digitalizados com o uso do fotodocumentador L-PIX EX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

Para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (INNIS et al., 1990) conforme condições descritas por Lopes (2010). A mistura da reação de PCR (25 µL) consistiu de tampão de PCR 1X (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0,2 mM da mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂; 0,5 pmol de cada primer, 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 10 ng de DNA. A PCR foi realizada em um termociclador (Amplitherm Thermal Cyclers) com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94 °C, 1 min; 56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) e um ciclo de extensão final de 5 min a 72 °C. Para visualização dos produtos da amplificação, 1 µL do produto da PCR final foi submetido a

eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (0,5x) usando o marcador de peso molecular 1 kb ladder plus (Invitrogen).

Os produtos da PCR foram purificados com o PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento do produto da PCR foi feito em um sequenciador MegaBACE 1000 utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator* kit (Amersham Biosciences) de acordo com Menna et al. (2006). As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas Phred/Phrap (EWING; GREEN, 1998) e editadas com o programa BioEdit (HALL, 1999).

As sequências ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 2). Adicionalmente uma árvore filogenética utilizando o software MEGA (versão 6.0) (TAMURA et al. 2013) foi construída para determinar e confirmar as relações evolutivas entre os isolados e as sequências de nucleotídeos de espécies tipo ou de referência, depositadas no *Genbank*.

4.3.3 Testes de atividade enzimática extracelular

Os isolados foram cultivados por três dias a 28 °C em meio YPD. Colônias frescas foram repicadas para placas contendo os meios de cultivo seletivos descritos a seguir e incubadas a 28 °C por 3-5 dias. A atividade enzimática foi avaliada pela formação de halo de degradação ao redor da colônia, a qual é indicativo visual da hidrólise dos respectivos substratos (STRAUSS et al., 2001; BUZZINI e MARTINI, 2002). O índice de atividade enzimática (IE) foi estimado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como $IE \pm$ desvio padrão.

Para avaliação da atividade celulolítica, as células foram cultivadas em meio YPD contendo 0.5% de carboximetilcelulose (CMC). Após crescimento, as placas foram coradas em solução de vermelho congo 0,1% por 15 minutos e descoradas em solução de HCl 1M até a visualização de halos claros, indicativos de atividade celulolítica (STRAUSS et al., 2001).

A avaliação da atividade lipolítica foi realizada em meio ágar tween (0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 1% de tween 80 e 1,5% de ágar, pH 6.0). Atividade positiva foi indicada pela formação de um halo opaco (com precipitados) ao redor da colônia (BUZZINI e MARTINI, 2002).

As atividades amilolítica e pectinolítica foram testadas em meio YNB™ (Difco) contendo, respectivamente, 0,2% de amido solúvel e 1,0% de pectina. Para revelação da atividade amilolítica o meio foi corado com solução de iodo 1% e descorado com água destilada, até a formação de um halo claro. A atividade pectinolítica foi revelada após tratamento por 10 minutos com solução de brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 1% e formação de halo opaco (BUZZINI e MARTINI, 2002).

A atividade proteolítica foi testada em meio mínimo (1% de glicose, 0,6% de NaNO₃, 0,15% de KH₂PO₄, 0,05% de KCl, 0,05% de MgSO₄, 0,001% de FeSO₄, 0,001% de ZnSO₄, 2% ágar, pH 6,5) (PONTECORVO et al., 1953) suplementado com 2% de caseína. A atividade positiva foi indicada pela formação de um halo claro ao redor da colônia (STRAUSS et al., 2001).

4.3.4 Quantificação da atividade lipolítica

Os isolados selecionados para os ensaios de atividade lipolítica foram inicialmente pré-cultivados em 3 mL de meio YPD líquido (12 h, 150 rpm a 25 °C); em seguida a concentração do inóculo foi padronizada com o auxílio do espectrofotômetro ($DO_{600nm} = 2$), 500 µL desta preparação foi adicionada a erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio para a produção de lipase (4 g/L de glicose; 6 g/L de sulfato de amônio; 1 g/L de fosfato de potássio dibásico e 0.5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado). 30 g de Tween 80 foram adicionados após 6 horas de cultivo (LIU et al., 2008 com modificações). Todos os frascos foram incubados por 120 h, 150 rpm e 25 °C. Amostras de 1 mL foram removidas em intervalos de 24 h, sendo o cultivo interrompido por centrifugação (9000 RCF, 15 min a 4°C), o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificar as proteínas e para avaliar a atividade lipolítica.

A dosagem de proteínas do sobrenadante foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) de forma que a absorbância foi relacionada à concentração de proteínas a partir da curva de calibração construída com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

Para quantificar a atividade lipolítica, de acordo com Winkler e Stuckmann (1979) uma emulsão do substrato palmitato de *p*-nitrofenil (pNPP) foi preparada pela adição, gota a gota, de 1mL da solução A (30 mg de pNPP dissolvidos em 10 mL de

isopropanol) em 9 mL da solução B (0,4 g Triton X-100; 0,1 g de goma arábica e 90 mL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0) sob intensa agitação. A emulsão obtida, assim como as amostras, foram estabilizadas durante 5 min à 37 °C. 0,2 mL do sobrenadante foram acrescentados a 1,8 mL da emulsão de substrato e a mistura foi incubada por 30 min. a 37 °C. Em triplicata, a absorbância das misturas foram mensuradas em 410 nm com auxílio de um espectrofotômetro Biospectro SP-220. Uma unidade (U) de atividade enzimática, foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1,0 µmol *p*-nitrofenol por minuto sob estas condições (O *p*-nitrofenol foi quantificado por referência a uma curva padrão).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Isolamento e identificação molecular de leveduras

Estudos anteriores com a planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae), demonstram que a comunidade de fungos filamentosos nesta planta é muito estudada. Oki et al. (2009), identificaram dois gêneros de fungos filamentosos endofíticos: *Cladosporium* sp. e *Rhizoctonia* sp. entre os 8 micro-organismos que eles isolaram. Link e Onofre (2010) obtiveram 20 isolados de fungos filamentosos epífíticos que foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Cuzzi et al. (2012) isolaram 511 fungos filamentosos endofíticos, entre os quais havia o predomínio dos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. Com isso, podemos observar que a comunidade de fungos filamentosos nesta planta é diversificada, no entanto, estudos com os fungos leveduriformes, nunca foram realizadas.

Este trabalho investigou leveduras cultiváveis isoladas a partir flores da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae). Os 28 isolados obtidos (Figura 4) foram caracterizados com base nos aspectos morfológicos das colônias cultivadas em meio BDA e agrupados em morfotipos (branco, preto, marrom e salmão) (Figura 5).

De acordo com o agrupamento morfológico, um isolado do morfotipo 1 (branco), três do morfotipo 2 (Salmão), três isolados do morfotipo 3 (marrom) e dez

do morfotipo 4 (preto), foram escolhidos para serem identificados molecularmente com base na amplificação e sequenciamento da região do rDNA ITS1-5.8S-ITS2.

Com base na caracterização morfológica, análise da sequência do rDNA com sequências de leveduras depositadas no banco *GenBank* e construção de uma árvore filogenética (Tabela 2 e Figura 6) cinco espécies de leveduras dos gêneros *Starmerella*, *Occultifur*, *Rhodotorulla* e *Aureobasidium* foram identificadas. Observou-se ainda que os isolados do gênero *Aureobasidium* foram os mais prevalentes e incluíam espécies como *Aureobasidium pulullans* e *Aureobasidium leucospermi*.

Isolados de morfotipo 1 exibiam colônias brancas, opacas, superfície lisa e consistência mucóide. Neste grupo o isolado Bd 44 foi identificado como *Starmerella bombicola*, uma levedura reconhecida pela produção de soforolípidios, um surfactante não tóxico, biodegradável e que possui propriedades antimicrobianas e anticancerígenas (VERDARAMAN; VENKATESH, 2010). O gênero ao qual pertence esta levedura (*Starmerella*) foi criado para acomodar a fase sexual da levedura *Candida bombicola*, um micro-organismo inicialmente isolado a partir de flores (ROSA; LACHANCE, 1998).

Dois isolados de leveduras agrupados no morfotipo 2 apresentaram colônias com cor salmão, superfície lisa, detalhe ótico brilhante, borda regular e consistência pastosa. Estes isolados foram identificados como *Rhodotorula mucilaginosa*, uma espécie de levedura normalmente isolada a partir de diversos materiais como: água fresca (VAZ et al., 2011), fontes hidrotermais (GADANHO; SAMPAIO, 2005) geleiras (BUTINAR; SPENCER-MARTINS; GUNDE-CIMERMAN, 2007), leite fermentado (ROHM; ELISKASES-LECHNER; BRÄUER, 1992), animais (MILLER; MRAK, 1953), solo (DI MENNA, 1955) e também na filosfera de diversas espécies de plantas (BUZZINI; MARTINI, 2002. SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ; VRÁNOVÁ, 2009. LI et al., 2011). Várias aplicações biotecnológicas têm sido atribuídas a *R. mucilaginosa*, como a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (BUZZINI; MARTINI, 2002. DUARTE et al., 2013), carotenóides (AKSU; EREN, 2005), xilitol, etanol e arabitol (BURA; VAJZOVIC; DOTY, 2012). Além disso, a levedura *R. mucilaginosa* é estudada como uma *single cell oil* e ainda como biocontroladora de doenças pós colheita (LI et al., 2011). Apesar de ter sido incluída no morfotipo 2, o isolado Bd25, diferentemente dos outros isolados, possuía uma colônia puntiforme (1-2 mm) com

pouco muco e crescimento lento; de acordo com a análise da sequência do rDNA ele foi identificado como *Occultifur externus*, uma espécie de levedura já encontrada na serrapilheira (SAMPAIO et al., 1999) e também no substrato pantanoso (FELL et al., 2011) ao contrário da levedura *R. mucilaginosa*, o seu potencial biotecnológico ainda é pouco estudado, contudo, Cotes et al., 2011 relataram que este micro-organismo pode ser utilizado no controle biológico do fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Os isolados deste morfotipo 3 possuíam colônias com detalhe ótico opaco e diferenciam-se por produzir um pigmento marrom que se difundia pelo entorno da colônia. os três isolados deste morfotipo, foram identificados como *Aureobasidium leucospermi*, uma levedura patogênica para as plantas de *Leucospermum* sp. (CROUS et al., 2011).

O grupo predominante de leveduras isoladas a partir das flores da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) era composto por 20 isolados que apresentaram colônias de cor preta e consistência mucoide; contudo no meio BDA inicialmente as colônias tinham cor branca que se tornavam pretas após 7 dias. Todos os isolados do morfotipo 4 foram identificados como *A. pullulans*, um fungo *yeast-like* de grande importância econômica pois ele pode ser utilizado como produtor do polissacarídeo pululana, de compostos sideróforos, bem como na produção de *single-cell protein* e ainda de diversas enzimas extracelulares tais como, proteases, lipases, amilases e xilanases; algumas estirpes também são capazes de controlar o crescimento de micro-organismos indesejados e têm sido utilizadas no biocontrole pós-colheita de diversas frutas (CHI et al., 2009). O *A. pullulans* possui distribuição cosmopolita, por isso, já foi encontrado inclusive em outras plantas medicinais, como aponta o estudo realizado no sul da Índia (KRISHNAMURTHY; NAIK; JAYARAM, 2008); onde se constatou que 5 entre 9 plantas selecionadas abrigavam *A. pullulans*, um dos micro-organismos mais prevalentes neste estudo, assim como também aconteceu na presente investigação.

4.4.2 Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares

A atividade lipolítica foi a mais prevalente (Figura 7) com cerca de 95% de amostras positivas para a hidrólise de Tween 80. No entanto, a maioria dos isolados mostrou atividades para a produção de mais de uma enzima testada.

Setenta e um por cento (71%) dos isolados apresentaram atividade proteolítica de acordo com as condições testadas. O IE para a atividade desta enzima variou entre 1,5 a 9,3 (Tabela 3); sendo que quatro isolados (Bd20, Bd22, Bd26 e Bd31), todos pertencentes ao gênero *Aureobasidium*, mostraram IE maiores do que 2,5, dentre eles o isolado Bd22 foi o mais promissor com IE que chegou a 9,3. Estes valores são expressivos comparados aos obtidos em outros estudos (STRAUSS et al., 2001. BUZZINI; MARTINI, 2002. CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006. BUENO et al., 2009. MAUTONE et al., 2010). As proteases são amplamente utilizadas em formulações de detergentes, curtimento de couro, recuperação de prata, processamento de alimentos, tratamento de resíduos e outros aplicativos (VELOORVALAPPIL et al., 2013). Nossos resultados mostraram que as leveduras do gênero *Aureobasidium* sp. isoladas, da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) são fontes microbianas promissoras de proteases.

Setenta por cento (70%) dos isolados testados foram capazes de hidrolisar a carboximetilcelulose (Tabela 3). A maioria dos isolados que apresentaram atividade celulolítica pertenciam ao gênero *Aureobasidium* sp. e os IE encontrados neste ensaio foram semelhantes aos encontrados por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004). No entanto Buzzini e Martini (2002) não observaram atividade celulolítica nos 197 ascomicetos (representantes de 23 espécies de oito gêneros), 155 basidiomicetos (representativos de 10 espécies de três gêneros) e 46 de isolados de *yeast-like* (*A. pullulans*), que pesquisaram. Além disso, apenas 4,1% das leveduras selvagens obtidas a partir de flores, frutas e solos de biomas brasileiros apresentaram atividade celulolítica (GOLDBECK et al., 2012). A alta frequência de leveduras celulolíticas exibidas pelos isolados neste trabalho indica que a filosfera de *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) é um habitat propício para leveduras produtoras de celulase. Desta forma, os isolados deste estudo podem ser considerados promissores para aplicações em processos biotecnológicos nos quais as celulases são necessárias, como a conversão de biomassa em etanol, na indústria têxtil, entre outros.

Neste trabalho, 55% dos isolados de leveduras, exibiram halo amarelo ao redor das colônias após a adição de iodo, indicando a degradação do amido devido a produção de amilase (Tabela 3). Quando comparado com os resultados de IE obtido por leveduras estudadas anteriormente por Buzzini e Martini (2002) ou pelos IE encontrados nos fungos endofíticos *Aspergillus* e *Phomopsis* sp. (CUZZI et al., 2012), ou ainda IE obtidos por leveduras isoladas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam

(COSTA, ABREU-LIMA e CARREIRO, 2011) nossos resultados demonstram atividade amilolítica maior. Amilases são amplamente utilizadas na indústria de alimentos (LI et al., 2007); assim como as pectinases que são usadas principalmente na clarificação de suco de frutas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Nesta investigação somente isolados de leveduras pertencentes ao gênero *Aureobasidium* apresentaram atividade pectinolítica, é preciso destacar ainda que de acordo com o IE os isolados mais eficientes na degradação do amido e da pectina foram os isolados de *A. leucospermi* (Tabela 3).

A atividade mais proeminente entre os isolados de levedura isolados de *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) foi a lipolítica. Os IE aferidos variaram entre 2,3 e 6,9 com cerca de 70% dos isolados com alta atividade (IE > 5,0) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Buzzini e Martini (2002) em leveduras isoladas a partir de florestas tropicais; no entanto, estes resultados foram muito superiores aos encontrados em *Aspergillus* sp. isolados da caatinga (LIMA et al., 2014) e *Nocardis* e *Bacillus* sp. obtidos a partir *Pachyrhizus erosus* L. Urban (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Lipases fúngicas constituem um importante grupo de enzimas utilizadas nas indústrias de processamento de óleos e gorduras, alimentos, couro, têxtil, detergentes, papel, na química fina, na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos, na degradação de ácidos graxos e resíduos (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Considerando os bons resultados obtidos, nos ensaios qualitativos; três isolados de *A. pullulans* foram escolhidos para a quantificação da atividade lipolítica extracelular. Como pode ser observado na Figura 8, após 72 horas de cultivo os três isolados apresentaram níveis de atividade específica desta enzima que variaram entre 38,4 e 42,6 U/mg, resultados muito superiores ao encontrado por Leathers et al. (2013) em 12 diferentes clados filogenéticos de *A. pullulans* cujo maior resultado não chegou a metade do conseguido por esta investigação. No entanto os nossos resultados foram inferiores aos encontrados por Liu et al. (2008), mas cujos ensaios enzimáticos foram realizados com a enzima purificada. Estudos enzimáticos adicionais com os isolados Bd15, 26 e 39 são recomendáveis, já que diante de todos os resultados apresentados neste trabalho, existe uma grande possibilidade de que eles possam vir a se tornar excelentes fontes de enzimas lipolíticas alternativas as que já são utilizadas atualmente nos processos industriais.

4.5 CONCLUSÃO

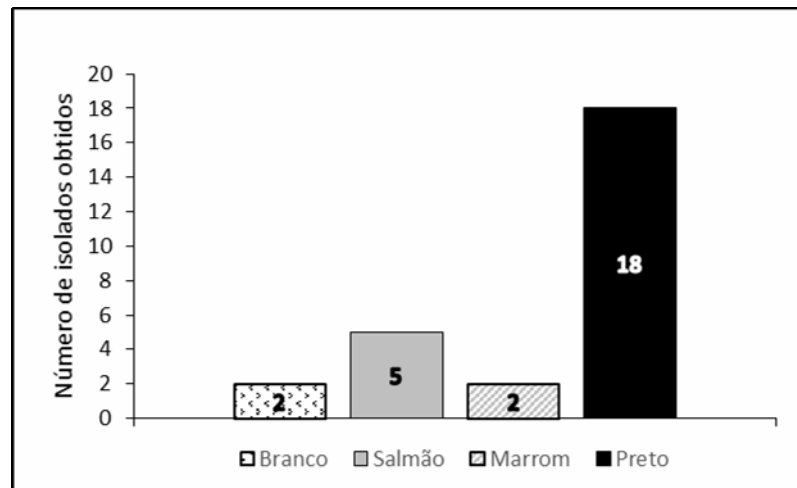
Os nossos resultados revelaram que a planta medicinal alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia* DC) de acordo com a metodologia utilizada de isolamento, é colonizada predominantemente na sua filosfera, no caso as flores, por leveduras do gênero *Aureobasidium* e que esta planta é um habitat promissor para leveduras produtoras de uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente lipases.

4.6 AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro, a Dr.^a Mariângela Hungria pelo apoio material, a Dr.^a Gisele M. de Andrade Nóbrega pelo auxílio na caracterização das leveduras, a Dr.^a Jakeline R. M. Delamuta e Dr. Renan A. Ribeiro pela assistência nas reações de sequenciamento.

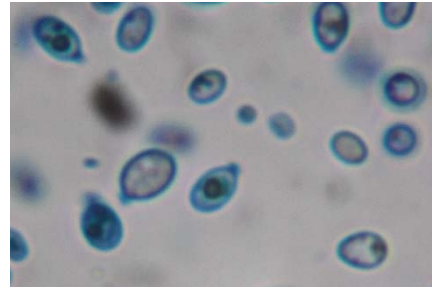
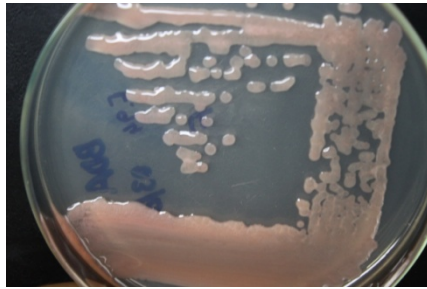
4.7 TABELAS E FIGURAS

Figura 4 - Ocorrência de isolados de leveduras associadas a planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* D.C (Asteraceae) de acordo com os morfotipos*.

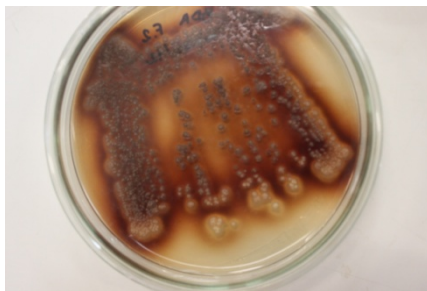


*Os morfotipos foram definidos de acordo com a coloração das colônias crescidas em meio BDA.

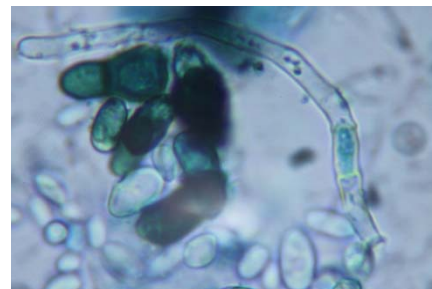
Figura 5 - Macro e micromorfologia de isolados de leveduras representantes dos seus morfotipos, obtidos a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)*.



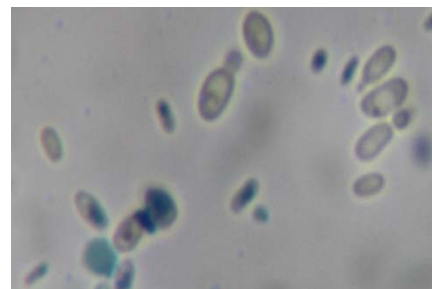
Bd 12



Bd 22



Bd 33



Bd 44

*A caracterização macroscópica foi realizada de acordo com o crescimento das colônias em meio BDA e a caracterização microscópica foi realizada a partir de imagens obtidas no microscópio óptico com um aumento de 100x.

Tabela 2 - Identificação taxonômica (gênero e espécie) de leveduras isoladas a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) com base nos níveis de similaridade encontrado da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA com sequências do rDNA provenientes de isolados de leveduras existentes no banco de dados *GenBank*.

Isolados	Morfotipos	Tamanho do amplicon	Identificação taxonômica (gênero e espécie)	Números de acesso	Correspondência mais próxima no <i>GenBank</i>	Números de acesso	Identidade (%)
Bd22	Marrom	620 bp	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KP731455	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	JN712489	99
Bd28	Marrom	610 bp	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KP731456	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	JN712489	99
Bd31	Marrom	650 bp	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KP731457	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	JN712489	97
Bd14	Preto	580 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731444	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX171163	100
Bd15	Preto	620 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731445	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AY213639	99
Bd16	Preto	580 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731446	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KF225046	100
Bd20	Preto	620 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731447	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KJ825981	100
Bd24	Preto	620 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731448	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AY213639	99
Bd26	Preto	600 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731449	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AY213639	99
Bd33	Preto	650 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731450	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AY213639	99
Bd36	Preto	650 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731451	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX171163	99
Bd37	Preto	600 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731452	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KF225046	100
Bd39	Preto	660 bp	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP731453	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AY213639	99
Bd25	Salmão	590 bp	<i>Occultifur externus</i>	KP731462	<i>Occultifur externus</i>	FN428895	99
Bd12	Salmão	630 bp	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	KP731463	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	KF646203	99
Bd18	Salmão	640 bp	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	KP731464	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	KF953890	99
Bd44	Branco	480 bp	<i>Starmerella bombicola</i>	KP731468	<i>Starmerella bombicola</i>	HQ111052	99

Fonte: Os autores

Figura 6 – Árvore filogenética construída pelo método de *neighbor-joining* com base nas sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de leveduras isoladas da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). Os números entre nós indicam os valores de bootstrap (%) com base em 1.000 repetições. A barra de escala corresponde a 0,2 substituições por posição de nucleótido. Os números entre parênteses indicam os números de acesso no *Genbank*. A levedura *Sympodiomyces attinorum* foi usada como *outgroup*.

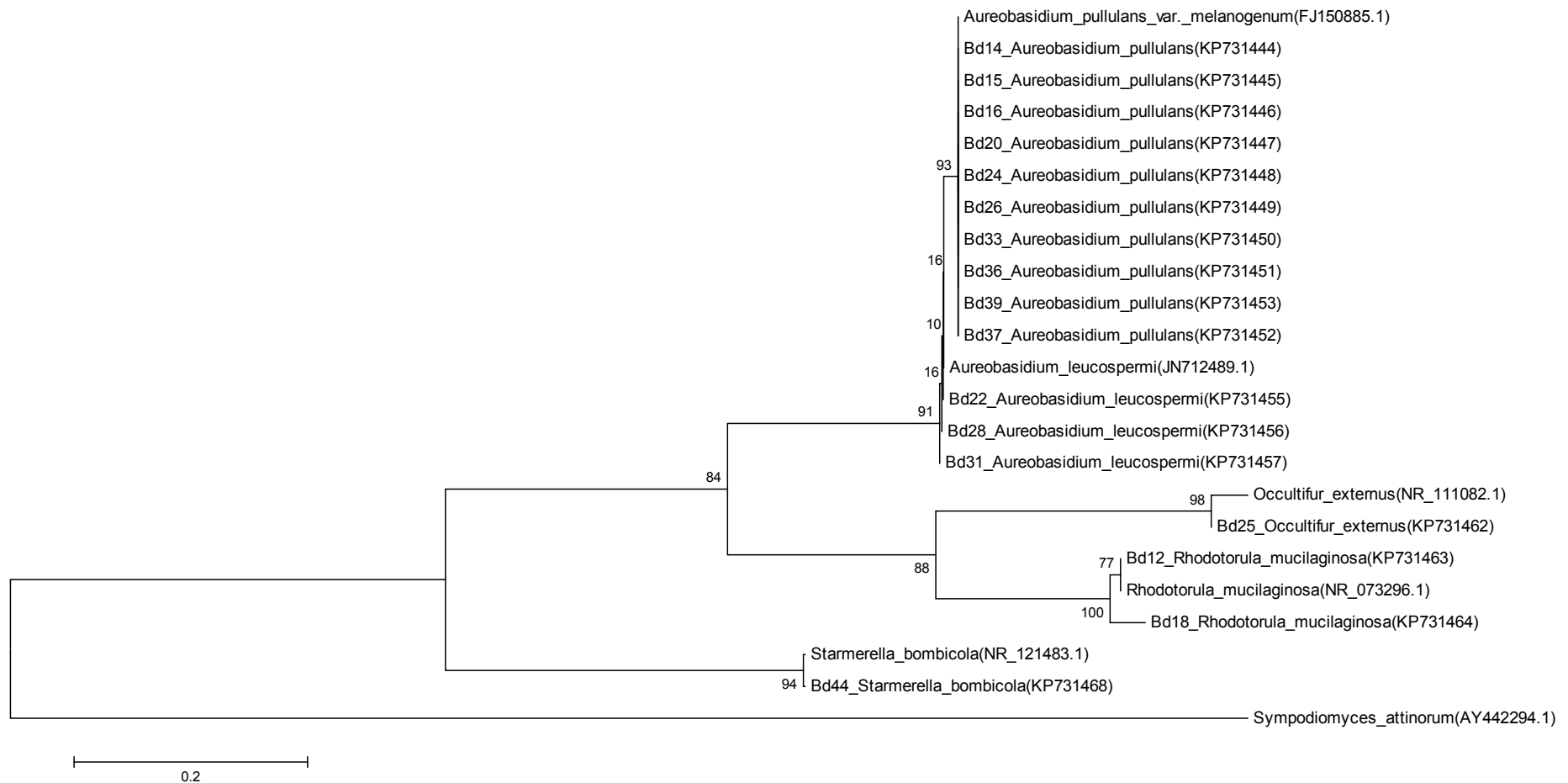


Figura 7 - Perfil de atividade enzimática de isolados de leveduras isoladas a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

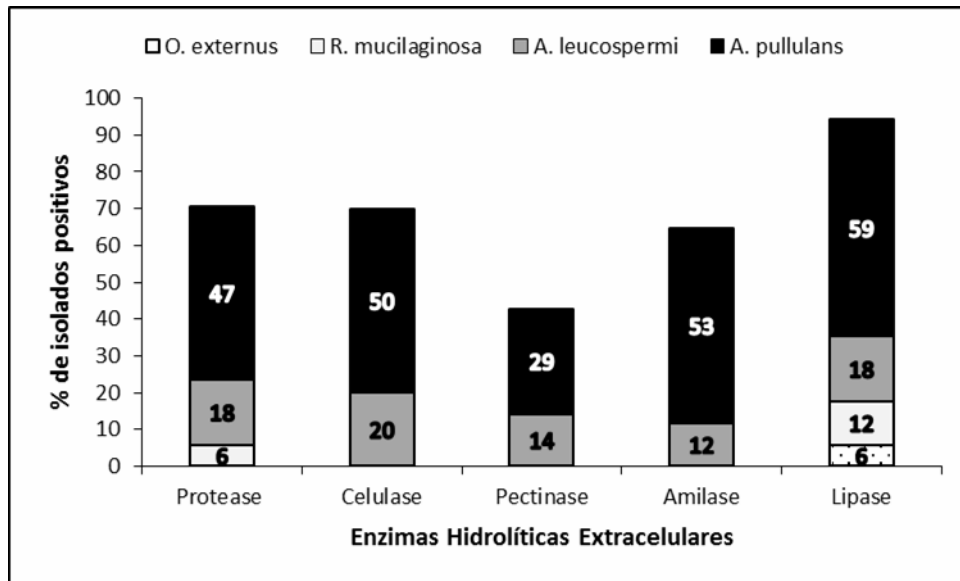
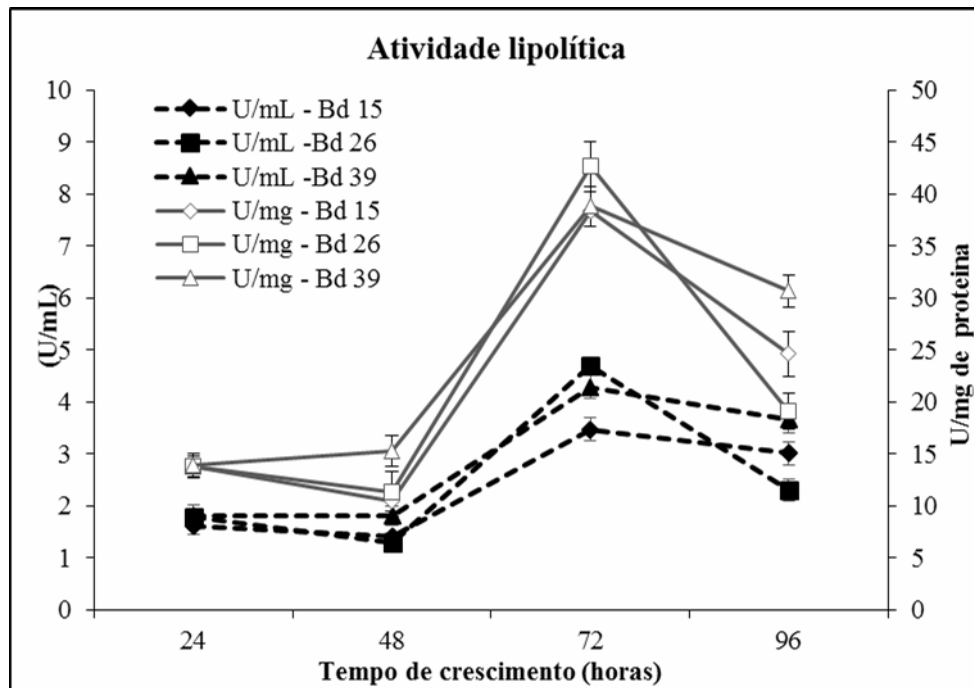


Tabela 3 – Análise semi-quantitativa da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares realizadas a partir do cálculo do índice enzimático (IE)

Identificação	Isolado/Morfotipo		Protease	Celulase	Pectinase	Lipase	Amilase
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	Bd22	Marrom	9.3 (±1.5)	nt	nt	5.4 (±0.3)	nd
	Bd28	Marrom	1.9 (±0.5)	2.8 (±0.3)	nd	5.7 (±0.5)	1.5 (±0.6)
	Bd31	Marrom	2.7 (±0.2)	3.5 (±0.2)	4.4 (±0.3)	3.9 (±1.3)	3.8 (±0.4)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bd14	Preto	2.0 (±0.2)	nt	nt	5.6 (±0.7)	1.1 (±0.1)
	Bd15	Preto	2.1 (±0.9)	nt	nt	6.5 (±2.2)	1.1 (±0.0)
	Bd16	Preto	nd	4.0 (±0.5)	2.7 (±1.2)	4.0 (±1.6)	nd
	Bd20	Preto	2.7 (±0.3)	nt	nt	6.0 (±0.4)	1.1 (±0.1)
	Bd24	Preto	1.5 (±0.4)	nt	nt	5.8 (±0.5)	1.3 (±0.1)
	Bd26	Preto	2.5 (±0.6)	nt	nt	6.9 (±1.0)	1.7 (±0.5)
	Bd33	Preto	nd	4.0 (±0.2)	3.3 (±0.5)	4.4 (±1.2)	1.4 (±0.0)
	Bd36	Preto	2.0 (±0.3)	3.8 (±0.3)	nt	5.6 (±0.7)	1.3 (±0.1)
	Bd37	Preto	2.1 (±0.2)	3.8 (±0.4)	nt	5.5 (±0.9)	1.2 (±0.1)
Bd39	Preto	2.1 (±1.0)	3.7 (±0.3)	nt	6.3 (±0.3)	1.8 (±0.1)	
<i>Occultifur externus</i>	Bd25	Salmão	nd	nt	nt	5.6 (±0.3)	nd
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	Bd12	Salmão	nd	nd	nd	2.3 (±0.2)	nd
	Bd18	Salmão	1.9 (±0.2)	nd	nd	6.7 (±0.9)	nd
<i>Starmerella bombicola</i>	Bd44	Branco	nd	nd	nd	nd	nd

Fonte: Os autores

Médias de três repetições ± desvio padrão; nd=não detectado; nt=não testado.

Figura 8 – Produção de lipase em meio líquido

4.8 REFERÊNCIAS

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**. v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. v. 38, n. 1, p. 145-180, 2000.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 1998. p. 352-367.
- AUSUBEL, F. **Short protocols in molecular biology: a compendium of current protocols in molecular biology**. Indianápolis: John Wiley and Sons, 2002. 232 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- BUDEL, J. M. et al. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.
- BUENO, C. J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**. v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.
- BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.
- BUTINAR, L.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 91, n. 3, p. 277-289, 2007.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.
- CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 3, p. 353-359, 2006.
- CHI, Z. et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82, n. 5, p. 793-804, 2009.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Biociências**. v. 17, n. 2, 2014.

COTES, A. M. et al. SELECCIÓN DE LEVADURAS FILOSFÉRICAS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea*. **Fitopatología Colombiana**. v. 35, n. 2, p. 51-56, 2011.

CROUS, P. W. et al. Fungal pathogens of Proteaceae. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**. v. 27, p. 20-45, 2011.

CUZZI, C. et al. Endophytic fungi of the “vassourinha” (*Baccharis dracunculifolia* DC, Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 10, n. 2, p. 135, 2012.

DI MENNA, M. E. A search for pathogenic species of yeasts in New Zealand soils. **Journal of General Microbiology**. v. 12, n. 1, p. 54-62, 1955.

DUARTE, A. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**. v. 17, n. 6, p.1023-1035, 2013.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**. v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FABRI, R. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FELL, J. W. et al. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 99, n. 3, p. 533-549, 2011.

FIDALGO-JIMÉNEZ, A. et al. *Metschnikowia cubensis* sp. nov., a yeast species isolated from flowers in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 12, p. 2955-2961, 2008.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane yeasts. In: (Ed.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin: Springer, 2006. p.263-301.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P. Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. **Microbial Ecology**. v. 50, n. 3, p. 408-417, 2005.

GILBERTI, L. H. **POTENCIAL PARA O USO DA ESPÉCIE NATIVA, *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERACEAE) NA FITORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR ARSÊNIO**. 68p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GOLDBECK, R. et al. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 53, p. 11595-11603, 2012.

- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v. 42, n. 1, p.95-98. 1999.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**. v. 67, n. 3, p. 597-607,1975.
- INNIS, M. A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic press, 1990. 461 p.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.
- KINKEL, L. Fungal community dynamics. In: (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.253-270.
- KRISHNAMURTHY, Y. L.; NAIK, S. B.; JAYARAM, S. Fungal communities in herbaceous medicinal plants from the Malnad region, Southern India. **Microbes and Environments**. v. 23, n. 1, p. 24-28, 2008.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. 2077 p.
- LEATHERS, T. D. et al. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 10, p. 1701-1706, 2013.
- LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. 166 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Ribeirao Preto. 2009.
- LEVEAU, J. H.; LINDOW, S. E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 98, n. 6, p. 3446-3453, 2001.
- LI, H. et al. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, n. 5, p. 1006-1012, 2007.
- LI, R. et al. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**. v. 146, n. 2, p. 151-156, 2011.
- LIMA, B. F. D. et al. SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *Aspergillus* sp. ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO. **e-Xacta**. v. 7, n. 1, p. 147-157, 2014.
- LINDOW, S. E. Determinants of epiphytic fitness in bacteria. In: **Microbial Ecology of Leaves**. New York:Springer, 1991. p. 295-314.
- LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

- LINK, S.; ONOFRE, S. B. Microrganismos epifíticos da vassourinha *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v. 3, n. 1, p. 131-143, 2010.
- LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**. v. 40, n. 3, p. 445-451, 2008.
- LOPES, D. D. **Estudo molecular e morfológico de leveduras de processos fermentativos de produção de etanol**. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina – Londrina, 2010.
- MAUTONE, J. N. et al. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, n. 2, p.169-173, 2010.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 29, n. 4, p.315-332, 2006.
- MERCIER, J.; LINDOW, S. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.
- MILLER, M.; MRAK, E. Yeasts associated with dried-fruit beetles in figs. **Applied Microbiology**. v. 1, n. 4, p. 174-178, 1953.
- MOODY, S. A. et al. Variation in the responses of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290–315 nm). **Mycological Research**. v. 103, n. 11, p. 1469-1477, 1999.
- MORRIS, C. E. **Phyllosphere**. eLS, 2001. p.1-7
- MUNARI, C. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**. v. 30, n. 1, p. 22-28, 2010.
- OKI, Y. et al. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**. v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.
- PINTO, L. D. M. A.; DO PRADO, N. R. T.; DE CARVALHO, L. B. PROPRIEDADES, USOS E APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 8, n. 3, p. 25, 2011.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. v. 5, p. 141-238, 1953.
- PUGH, G.; BUCKLEY, N. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. In PREECE T. F; DICKSON. C. H. **Ecology of Leaf Surface Microorganisms**. CAB Direct, 1971. p. 431-45.

- ROHM, H.; ELISKASES□LECHNER, F.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 72, n. 5, p. 370-376, 1992.
- ROSA, C. A.; LACHANCE, M.-A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, n. 4, p. 1413-1417, 1998.
- RUEGGER, M. J.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.
- RUIVO, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da mata atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Picinguaba, São Paulo**. 2005. 80f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. 800 p.
- SAMPAIO, J. P. et al. *Occultifur externus* sp. nov., a new species of simple-pored auricularioid heterobasidiomycete from plant litter in Portugal. **Mycologia**. v. 91, n. 6, p. 1094-1101, 1999.
- SANTOS, D. A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.
- SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R.; VRÁNOVÁ, D. Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. **Annals of Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 419-424, 2009.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- STRAUSS, M. et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non□*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

VAZ, A. B. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, n. 3, p. 937-947, 2011.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. **Polish Journal of Chemical Technology**. v. 12, n. 2, p. 9-13, 2010.

VELOORVALAPPIL, N. J. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**. v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

5 REFERÊNCIAS GERAIS

- BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. A.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. p. 191- 221, 2010.
- BASSAN, C.F.D.; SACCARDI, A. Características botânicas da *Baccharis dracunculifolia*, “alecrim-do-campo ou vassourinha” nativa de Marília-SP e região e sua importância como flora apícola. **UNIMAR Ciências**. v.19, n.1-2, p.61-63, 2010.
- BERLINCK, R. G. D. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**. v. 64, n. 3, p. 27-30, 2012.
- BUDEL, J. M. et al. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.
- COMPANIES and MARKETS. Disponível em:
<<http://www.comandpaniesandmarkets.com/Market/Healthcare-and-Medical/Market-Research/Global-Markets-for-Enzymes-in-Industrial -Applications/RPT1072821> >
Acesso em: 05 de jan. 2015.
- CUZZI, C. et al. Endophytic fungi of the “vassourinha” (*Baccharis dracunculifolia* DC, Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 10, n. 2, p. 135, 2012.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**. v. 7, p. 1-19, 2006.
- FABRI, R. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.
- GILBERTI, L. H. **POTENCIAL PARA O USO DA ESPÉCIE NATIVA, *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERACEAE) NA FITORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR ARSÊNIO**. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- GOMES, V.; FERNANDES, W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**. v.16, n.4, p.421-427, 2002.
- GUNATILAKA, A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**. v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

- JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 21-44.
- KINKEL, L. Fungal community dynamics. In: (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.253-270.
- LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. 166 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Ribeirao Preto. 2009.
- LEVEAU, J. H.; LINDOW, S. E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 98, n. 6, p. 3446-3453, 2001.
- LINDOW, S. E. Determinants of epiphytic fitness in bacteria. In: **Microbial Ecology of Leaves**. New York:Springer, 1991. p. 295-314.
- LINK, S.; ONOFRE, S. B. Microrganismos epifíticos da vassourinha *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v. 3, n. 1, p. 131-143, 2010.
- MALAJOVICH, M. A. **BIOTECNOLOGIA 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012. 320 p.
- MARCHESAN, E. D. et al. Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**. v. 10, n. 2, p. 63-66, 2006.
- MERCIER, J.; LINDOW, S. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**. v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MONTESINOS, E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **International Microbiology**. v. 6, n. 4, p. 221-223, 2003.
- MOODY, S. A. et al. Variation in the responses of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290–315 nm). **Mycological Research**. v. 103, n. 11, p. 1469-1477, 1999.
- MOREIRA, H.; BRAGANÇA, H. **Manual de identificação de plantas infestantes: arroz**. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2010. 854 p.
- MORRIS, C. E. **Phyllosphere**. eLS, 2001. p.1-7
- MUNARI, C. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**. v. 30, n. 1, p. 22-28, 2010.

OKI, Y. et al. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**. v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

PEREIRA JR, Nei; BON, Elba P.S.; FERRARA. A Biotecnologia Microbiana: Conceitos e Aplicações. In: _____. **Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. p. 8-10.

POLITZER, K.; BON, E. **Enzimas Industriais e Especiais**. Rio de Janeiro: CGEE, 2006. 580 p.

PUGH, G.; BUCKLEY, N. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. In PREECE T. F; DICKSON. C. H. **Ecology of Leaf Surface Microorganisms**. CAB Direct, 1971. p. 431-45.

SANTOS, D. A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010.

SANTOS, R. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, p. 224-234, 2012.

SFORCIN, J. M. et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Editora Unesp, 2012. 103 p.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quimica Nova**. v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

YOUNG, P. Major microbial diversity initiative recommended. **ASM News**. v.63, n. 8 p.417-421, 1997.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: John Wiley & Sons, 1998. 336 p.