



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

JOSELMA PEDROSA DA SILVA

**LEVEDURAS FERMENTADORAS ASSOCIADAS A INSETOS DE IGARAPÉS
RORAIMENSES**

Boa Vista - RR
2017

JOSELMA PEDROSA DA SILVA

**LEVEDURAS FERMENTADORAS ASSOCIADAS A INSETOS DE IGARAPÉS
RORAIMENSES**

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

Orientador: Profº. Dr. Marcos Vital
Coorientadora: Profª. Drª. Fabiana Granja

Boa Vista - RR
2017

JOSELMA PEDROSA DA SILVA

**LEVEDURAS FERMENTADORAS ASSOCIADAS A INSETOS DE IGARAPÉS
RORAIMENSES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Recursos Naturais da
Universidade Federal de Roraima.
Avaliada pela seguinte banca
examinadora:

Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital (Orientador)

Prof. Dr^a Fabiana Granja (Coorientadora)

Membro examinador

Membro examinador

Membro examinador

Dedico a DEUS e minha família, em especial, minha mãe Maria Lenice, meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu rochedo e luz da minha vida.

À minha família pelo apoio, carinho e incentivo.

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

A minha Coorientadora, Dra. Fabiana Granja, pela orientação e ensinamentos.

Ao professor Ítalo Mattos pelos ensinamentos e colaboração.

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

A doutoranda Andréia da Silva Alencar por todos os ensinamentos, dedicação e carinho.

Ao Msc. Eduardo Brito pela colaboração e ensinamentos.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular em especial Clediane Gomes, Raissa, Ismael, Derlano e Márcia.

Aos bolsistas e ex-bolsistas de iniciação científica do laboratório de Microbiologia do CBio: Carol Dourado, José Wcleber, Daniele Rocha, Fabiane, Ângela, Richarlisson, Karla Dalila e Lucas Chagas, por toda colaboração e convivência.

Às Biólogas Suená Márcia e Keyty Oliveira pelo apoio diário.

À minha amiga best Vânia Lúcia Gonçalves de Sousa pelos momentos de descontração (para aliviar a tensão dos estudos), palavras de incentivo e carinho.

Ao Sr. Eder e família pelo acolhimento em Manaus.

Aos demais amigos pela compreensão da ausência em vários momentos.

Aos amigos e colegas da turma de Mestrado 2015.1.

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

A Universidade Federal de Roraima.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Lâmpada para os meus pés é tua palavra, e luz para
o meu caminho.
Salmos 119:105

RESUMO

A produção de etanol lignocelulósico está vinculada a leveduras capazes de fermentar a fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica. Porém existem poucos estudos que relatem sobre essa atividade, principalmente em isolados do trato intestinal de insetos com capacidade fermentativa e produção de biomassa fermentativa como fonte de carbono. As leveduras utilizadas nesta pesquisa foram isoladas do trato digestório de larvas insetos fragmentadores aquáticos, na Serra do Tepequém - RR. No total foram isoladas 22 leveduras, que foram testadas quanto à fermentação de glicose, galactose, maltose, melibiose e xilose. Houve fermentação por diferentes cepas em todos os açúcares, com exceção da xilose. As leveduras foram submetidas a testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, visando a identificação convencional. Foram identificadas molecularmente seis leveduras, pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Tremella* e *Yamadazyma*. As demais estirpes estão em processo de identificação. Seis cepas selecionadas como potencialmente fermentadoras foram avaliadas quanto a capacidade de produção de etanol, utilizando hidrolisado da casca de abacaxi como única fonte de carbono, com produção de etanol de até 53,4 g/L e rendimento de até 0,81 g/L.

Palavras-chave: Abacaxi. Biomassa. Etanol. Fermentação. Roraima.

ABSTRACT

Production of lignocellulosic ethanol is linked to yeast capable of fermenting the hemicellulosic of lignocellulosic biomass. However, there are few studies that describe about this activity, especially in isolates from intestinal tract of insect with fermentative capability and fermentative biomass production as carbon source. The yeasts utilized in this research were isolated from digestive tract of aquatic fragmenting insects, in Serra do Tepequém – RR. In total, 22 yeast were isolated and were tested regarding glucose, galactose, maltose and melibiose fermentation. There was fermentation by different strains in all sugars, except xylose. The yeast were submitted to morphological, physiological and biochemical tests, aiming to its conventional identification. Six yeasts were molecularly identified, belonging to the genera: *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Tremella* and *Yamadazyma*. The rest of the strains are still on identification process. Six strains selected with fermenting potential were evaluated regarding ethanol production capability, using pineapple peel hydrolyzed as only carbon source, with ethanol production up to 53.4 g/L and yield up to 0.81 g/L.

Keywords: Pineapple, Biomass, Ethanol, Fermentation, Roraima.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Posição dos iniciadores no DNA ribossômico.....	17
Figura 2	Fluxograma das atividades realizadas na pesquisa.....	28
Figura 3	Região da Serra do Tepequém, em destaque os dez igarapés selecionados para coleta de insetos fragmentadores.....	30
Figura 4	Esquema geral de coleta de insetos fragmentadores em igarapés na Serra do Tepequém-RR.....	31
Figura 5	Procedimentos para determinação do perfil fisiológico e bioquímico de leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores.....	36
Figura 6	Procedimentos para a produção da farinha da casca de abacaxi...	43
Figura 7	Avaliação da produção de etanol por leveduras em fermentômetro.	45
Figura 8	Insetos fragmentadores coletados em igarapés na Serra do Tepequém-RR.....	49
Figura 9	Variação de cor nos aspectos morfológicos de leveduras isoladas de fragmentadores dos gêneros <i>Stenochironomus</i> e <i>Phylloicus</i> coletados na Serra do Tepequém – RR.....	56
Figura 10	Aspectos microscópios de leveduras isoladas de fragmentadores da Serra do Tepequém-RR.....	58
Figura 11	Leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores da Serra do Tepequém - RR, inoculadas em meio de cultura sem aminoácidos.....	60
Figura 12	Amostras de DNA de leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém /RR, com protocolo de De Hoog et al 2005. Marcador Lâmbda (100ng/ µL), gel de agarose 0,8%.....	63
Figura 13	Perfil de Amplificação de leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém /RR, utilizando iniciador NL1 e NL4, padrão <i>Ladder</i> (100 pb), gel de agarose 1,2%.....	63
Figura 14	Perfil de Amplificação de leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém /RR, utilizando iniciador ITS1 e ITS4, padrão <i>Ladder</i> (100 pb), gel de agarose 1,2%.....	64
Figura 15	Cladograma filogenético do gênero <i>Aureobasidium</i> com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.....	67
Figura 16	Cladograma filogenético do gênero <i>Yamadazyma</i> com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.....	68
Figura 17	Cladograma filogenético do gênero <i>Tremella</i> com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.....	69
Figura 18	Produção de etanol pelas leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém – RR.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pontos de denominação dos igarapés onde foram coletados insetos fragmentadores, na Serra do Tepequém-RR.....	30
Tabela 2	Dados abióticos dos igarapés selecionados para coleta dos insetos fragmentadores na Serra do Tepequém – RR.....	48
Tabela 3	Contagem e frequência dos isolados de insetos fragmentadores coletados em igarapés da Serra do Tepequém – RR.....	52
Tabela 4	Perfil fermentativo das leveduras isoladas de insetos fragmentadores em igarapés da Serra do Tepequém /RR.....	54
Tabela 5	Características macromorfológicas das leveduras isoladas de fragmentadores da Serra do Tepequém-RR.....	57
Tabela 6	Classes das leveduras isoladas de fragmentadores da Serra do Tepequém-RR, divididas entre os grupos basidiomicetos e ascomicetos pela reação ao corante DBB.....	61
Tabela 7	Leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém/RR, tamanho do fragmento, tamanho da sequência (ITS1/ITS4), similaridade e acesso ao GenBank.....	65
Tabela 8	Biomassa produzida durante o ensaio em fermentômetro e ART consumido pelas leveduras fermentadoras isoladas de insetos fragmentadores coletados em igarapés da Serra do Tepequém – RR.....	73
Tabela 9	Produção de Etanol pelas leveduras isoladas da Serra do Tepequém-RR.....	78
Tabela 10	Rendimento de Etanol pelas leveduras isoladas da Serra do Tepequém-RR.....	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	INSETOS FRAGMENTADORES.....	13
1.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE INSETOS FRAGMENTADORES E MICRORGANISMOS.....	14
1.3	LEVEDURAS.....	15
1.3.1	Taxonomia de leveduras.....	16
1.4	USO BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS.....	18
1.4.1	Fermentação.....	19
1.4.2	Produção de etanol.....	22
1.5	UTILIZAÇÃO DE FONTES RENOVÁVEIS NA PRODUÇÃO DE BIOCONBUSTÍVEIS.....	23
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	29
3.2	AMOSTRAGEM.....	29
3.2.1	Coleta de insetos fragmentadores.....	31
3.3	ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO.....	32
3.3.1	Dissecação dos insetos fragmentadores.....	32
3.3.2	Isolamento das leveduras.....	33
3.3.3	Contagem das leveduras.....	33
3.3.4	Obtenção da cultura pura.....	33
3.3.5	Preservação das leveduras.....	34
3.3.6	Seleção da leveduras fermentadoras.....	34
3.4	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	34
3.4.1	Identificação Convencional.....	35
3.4.1.1	Testes morfológicos.....	35
3.4.1.2	Testes fisiológicos e bioquímicos.....	35
3.4.2	Identificação Molecular.....	38
3.4.2.1	Extração Total do DNA.....	38
3.4.2.2	Amplificação utilizando os iniciadores ITS1/ITS4.....	39
3.4.2.3	Sequenciamento.....	40
3.4.2.4	Análise das Sequências.....	41
3.4.2.5	Análise Filogenética.....	42
3.5	FERMENTAÇÃO DE PENTOSSES.....	42
3.5.1	Substrato.....	42
3.5.2	Obtenção do hidrolisado da casca de abacaxi.....	43
3.5.3	Preparação do inóculo para fermentação.....	44
3.5.4	Fermentação.....	44
3.5.5	Determinação da concentração de etanol.....	45
3.5.6	Análise da produção de etanol.....	46
3.6	ANÁLISE ESTÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS LOCAIS DE COLETA.....	47
4.2	INSETOS FRAGMENTADORES COLETADOS.....	49
4.3	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS.....	51
4.4	PERFIL FERMENTATIVO DAS LEVEDURAS.....	52
4.5	IDENTIFICAÇÃO CONVENCIONAL.....	55

4.5.1	Perfil morfológico das leveduras.....	55
4.5.2	Perfil fisiológico e bioquímico das leveduras.....	58
4.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	62
4.6.1	Extração de DNA	62
4.6.2	Análise das sequências de leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém – RR.....	64
4.6.3	Análise filogenética de leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém – RR	66
4.7	PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS LEVEDURAS FERMENTADORAS.....	71
4.7.1	Fermentação com hidrolisado da casca de abacaxi.....	71
4.7.2	Rendimento da produção de etanol.....	74
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
5	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICES.....	91

1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia é uma importante ferramenta de conhecimento e utilização dos recursos biológicos pela humanidade, proporcionando o estudo de novas alternativas para minimizar os impactos causando dentre várias possibilidades as intensas mudanças climáticas e emissões de gases procedentes da utilização de combustíveis fósseis. Visando o uso de fontes renováveis de energia, as leveduras se tornaram objetos de pesquisas devido à capacidade de assimilar açúcares, pelo seu crescimento rápido, por serem termotolerantes e secretarem enzimas. Esses microrganismos são empregados na indústria de alimentos, bebidas e biocombustíveis e podem ser encontrados no solo, na água, na vegetação ou ainda associados a animais, como por exemplo, os insetos aquáticos fragmentadores.

No Brasil, o processo de produção de etanol utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima. O bioetanol produzido a partir de resíduos da agricultura e florestas exige um organismo fermentador, que transforme todos os tipos de açúcares obtidos da matéria prima em etanol eficientemente. Além da cana-de-açúcar outras opções de matéria prima são utilizadas na produção de biocombustíveis como, por exemplo, a casca do abacaxi, que também é utilizada nas indústrias de bebidas fermentadas.

Devido ao grande potencial microbiológico da Região Amazônica e a crescente aplicabilidade das leveduras na área biotecnológica, a seleção e identificação desses microrganismos fermentadores são de fundamental importância. A microbiota do trato intestinal de insetos aquáticos fragmentadores é pouco conhecida. A interação entre leveduras e insetos fragmentadores pode resultar em uma grande diversidade de novas espécies de microrganismos com potencial biotecnológico, assim como contribuir para o entendimento das relações simbióticas entre ambos.

Em Roraima existem ambientes que pouco ou nunca foram explorados microbiologicamente. Fato que reforça a importância de estudos sobre o isolamento e identificação de microrganismos. Nesse contexto, o foco desta pesquisa é a prospecção de leveduras, isoladas do trato intestinal de larvas insetos fragmentadores de detritos vegetais, com potencial para fermentação de pentoses com aplicações biotecnológicas.

Diante disso, se constitui os problemas para essa pesquisa: Existem leveduras associadas ao trato intestinal de insetos aquáticos fragmentadores em igarapés roraimenses, e essas possuem capacidade de fermentar pentoses? As leveduras

foram isoladas de insetos aquáticos fragmentadores, dos gêneros *Stenochironomus* e *Phylloicus*, de 10 igarapés em área de floresta na região do Tepequém, município de Amajari/RR. Esta proposta faz parte do projeto “Diversidade de macroinvertebrados fragmentadores e fungos associados na produção de enzimas aplicadas a produção do bioetanol”, da Rede Bionorte, financiado pelo CNPq.

1.1 INSETOS FRAGMENTADORES

Os insetos fragmentadores são macroinvertebrados que participam diretamente da redução e degradação da matéria orgânica e que abrigam no trato intestinal uma abundância de microrganismos, como bactérias, protozoários e fungos (OLIVEIRA; NESSIMIAN, 2010). Esses insetos possuem atividade celulolítica no aparelho digestivo, que em associação com microrganismos degradam a celulose, sua principal fonte de alimento (KOROIVA et al., 2013).

Alguns insetos aquáticos fragmentadores se alimentam de qualquer matéria orgânica disponível no ambiente, por exemplo, os insetos das famílias Chironomidae e da ordem *Diptera* (HAMADA; NESSIMIAN; QUERINO). Já os insetos fragmentadores da família *Trichoptera* são mais seletivos, utilizando preferencialmente folhas de qualidade nutricional superior às demais, geralmente folhas já exploradas por microrganismos, como bactérias e fungos, os quais produzem enzimas que degradam a celulose presente no substrato (folha ou tronco). A degradação diminui a massa e amolece as estruturas das folhas e troncos em decomposição, tornando o substrato mais palatável para os fragmentadores (CALLISTO; GONÇALVES; GRAÇA et al., 2007).

Assim, os nutrientes são incorporados aos detritos pelos microrganismos, aumentando o valor nutricional do resíduo para os invertebrados aquáticos (GRAÇA; CRESSA, 2010). Porém, para cada fragmentador existe um detrito adequado, dependendo da composição química, estrutura física e estado de degradação, podendo as características dos detritos variarem ao longo do tempo e de exposição no ambiente aquático (ABELHO, 2001; GRAÇA, 2001).

A abundância dos insetos aquáticos fragmentadores em um ambiente depende da composição de matéria orgânica tanto para alimento quanto para o abrigo (MORETTI et al., 2007) e suas atividades alimentares afetam diretamente as taxas de

decomposição foliar (BASTIAN et al., 2007). Além dos fragmentadores, os raspadores podem atuar indiretamente como fragmentadores quando atuam na superfície do detrito, quebrando a resistência, facilitando a colonização de microrganismos decompositores (WANTZEN; WAGNER, 2006).

1.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE INSETOS FRAGMENTADORES E MICRORGANISMOS

Numerosas associações entre animais invertebrados e microrganismos endossimbióticos foram descritos ao longo do século passado (BUCHNER, 1965; NARDON; GRENIER, 1989). Invertebrados dependem de microrganismos para várias funções metabólicas, incluindo síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídios, degradação de substratos, nutrientes e desintoxicação de compostos inibidores. Nos ecossistemas terrestres e aquáticos existem contínuas associações simbióticas entre insetos e fungos, que variam de interações casuais em um habitat compartilhado, sendo as enzimas microbianas fundamentais para a sobrevivência de vários insetos (MARTIN, 1987). Os microrganismos são importantes contribuintes nas habilidades dos insetos em utilizar recursos nutricionais intratáveis e ocupar habitats que, de outra maneira, não estariam acessíveis.

Dentre os insetos, as vespas de madeiras, adquirem enzimas fúngicas com o objetivo de degradar partes de plantas (folhas, galhos e troncos) e térmitas cultivam fungos ou outros simbiossiontes intestinais, para quebrar seus alimentos celulósicos (GILBERTSON, 1984).

Larvas de insetos fragmentadores do gênero *Stenochironomus* Kieffer, 1919 possuem hábito minador, constroem galerias em troncos e folhas submersas, local onde geralmente são encontrados, são minadores xilófagos de folhas e troncos de árvores, cosmopolitas, com adaptações morfológicas para este tipo de colonização (LANDEIRO et al., 2010).

Ainda de acordo com Landeiro et al. (2010), larvas dos gêneros *Phylloicus* Müller, 1880 e *Triplectides* Koleniti, 1859 predominam em corredeiras e remansos, são frequentes em locais com pouca correnteza, geralmente agregadas a folhas e galhos. Esses fragmentadores são considerados trituradores de matéria orgânica, em especial, a grossa.

Particularmente quanto ao gênero *Triplectides*, estes ainda podem se raspadores, herbívoros e fragmentadores de matéria orgânica particulada grossa e fina. No processo de fragmentação gera um aumento da superfície susceptível à ação dos microrganismos. Portanto esses macroinvertebrados obtêm alimento não somente da folha em si, mas também dos microrganismos, especialmente fungos filamentosos e leveduras, que a colonizam (KOROIVA et al., 2013). O trato intestinal dessas larvas de insetos tem sido um modelo para estudos de diversidade de fungos filamentosos e leveduriformes e também para compreensão das relações simbióticas entre estes (LICHTWARDT, 2012, SUH et al., 2005). A madeira é considerada também como substrato por algumas espécies de besouros

1.3 LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos eucarióticos pertencentes ao Reino *Fungi*, formados por uma única célula, com parede celular rígida, citoplasma com mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, possuem membrana nuclear e são aclorofiladas. A nutrição é heterotrófica e ocorre por meio da absorção de nutrientes; a reprodução é geralmente de forma assexuada, por brotamento ou fissão, e também sexuada por produção de esporos, estados sexuais que não são colocados em corpos de frutificação (KURTZMAN et al., 2011; NEVES, PORTO, TEIXEIRA, 2006). Esses microrganismos podem ser encontrados amplamente distribuídos no ar, no solo, na água, em áreas cobertas ou não por vegetação, grãos de cereais, podem ainda ser isolados da pele e do intestino de animais, bem como em associações com os insetos, de acordo com Hagler et al. (2013).

Em estudos com besouros encontrados em madeira, Nguyen et al. (2006) encontraram uma espécie nova de levedura, isolada do intestino de besouros presentes em madeira, descrita como *Spathaspora passalidarum*. Novas estirpes de leveduras encontradas no trato digestório de besouros foram também identificadas no clado *Pichia guilliermondi*, e apresentaram capacidade de fermentar celobiose (SUH; BLACKWELL, 2004).

1.3.1 Fermentação

Fermentação é um processo anaeróbico de síntese de ATP (Trifosfato de adenosina) que não envolve respiração. Um fenômeno realizado por bactérias e fungos que decompõe o substrato. Esse processo pode ocorrer de duas formas: a hidrólise e a sacarificação separadas (SHF), pela degradação da celulose a um açúcar fermentável; e a sacarificação simultaneamente com fermentação (SSF), esse procedimento simultâneo aumenta o rendimento na indústria de etanol, além de reduzir o custo na produção em relação a SHF. O grande desafio para SSF são as condições de pH e principalmente de temperatura na fermentação e sacarificação. Por essa razão, estudos têm sido realizados buscando leveduras com grande potencial termotolerante que otimizem a SSF de materiais lignocelulósicos (COSTA et al., 2014).

Para o processo de SSF é necessário que ocorra a hidrólise da parede celular da célula vegetal, composta de celulose, hemicelulose e lignina, constituintes da biomassa. A hemicelulose é um polissacarídeo composta por diferentes açúcares, alguns com cinco carbonos, apresenta potencial para produção de etanol utilizando microrganismos específicos no processo de fermentação. Enquanto que a lignina é um polímero tridimensional com elevado peso molecular, em geral considerado inibidor na digestão da parede celular de plantas, principalmente de forrageiras, que liberam energia durante o aquecimento nas caldeiras e equilibram o balanço energético da indústria. Em médio e longo prazo existe possibilidade de utilizar a lignina na produção de outros produtos com maior valor agregado. A celulose, por sua vez, durante o processo fermentativo utilizando microrganismos com potencial de fermentar materiais lignocelulósicos, ricos em pentose, é hidrolisada e origina a glicose e a sacarose (RAMOS et al., 2011).

Alguns desses microrganismos potencialmente fermentadores têm dificuldade de degradar compostos como a lignina. Por isso, para que a fermentação ocorra são necessários os pré-tratamentos termoquímicos e sacarificação enzimática. Na produção de biogás, açúcares não fermentescíveis resultantes da fermentação são utilizados como excelentes biofertilizantes. Já no processo de fermentação alcoólica, as leveduras utilizam as hexoses, tornando-se um desafio controlar a eficiência da fermentação com biomassa lignocelulósica (MERICO et al., 2007). *S. cerevisiae* estão presentes na maioria dos processos biotecnológicos, tornando-se indispensáveis na produção industrial de bebidas alcoólicas no mundo. Esses microrganismos apresentam potencial tanto econômico quanto tecnológico. A qualidade das bebidas

alcoólicas evidencia o potencial das leveduras nas condições de fermentação, por meio desse metabolismo são fabricados diversos tipos de bebidas alcoólicas, como se lê em Parente et al. (2014).

Inseridas no grupo das anaeróbicas facultativas, as leveduras fermentam hexose independente da presença de oxigênio. Sua fonte preferencial de carbono é a glicose, devido ao processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, chamado de repressão catabólica da glicose. Outra vantagem de utilizar as leveduras é a capacidade de assimilar celobiose, de grande importância na indústria de biocombustível como o etanol, produzido a partir de hidrolisados de resíduos (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Ainda de acordo com os autores acima citados, as leveduras fermentam glicose em etanol e CO₂, convertendo glicose em piruvato pela glicólise. O piruvato, por sua vez, é convertido em etanol e CO₂ em um processo de duas etapas: primeiramente, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação catalisada pela piruvato descarboxilase, uma reação simples que não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer Mg²⁺ e possui uma coenzima diretamente ligada a tiamina pirofosfato. Na segunda etapa da fermentação, por meio da ação das enzimas álcool desidrogenase e acetaldeído desidrogenase, ocorre a redução a etanol, com o NADH, derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que fornece o poder redutor. Assim os produtos finais da fermentação alcoólica são o etanol e o CO₂, de acordo com a equação geral da fermentação:



As leveduras possuem a capacidade de fermentar pentose, como por exemplo, *Candida shehatae*, que tem o potencial de metabolizar pentoses com pouca produção de xilitol e aparentemente tolerância a etanol (DU PREEZ et al., 1994). Segundo Amorim et al. (2011), a levedura *S. cerevisiae* também possui capacidade de fermentar pentoses.

Portanto, existe necessidade de buscar por novas estirpes de leveduras capazes de fermentar açúcares de forma eficiente para produção de bioetanol. Algumas leveduras na ausência de oxigênio intensificam a reação do NADH com o piruvato, gerando NAD⁺ e ácido láctico, produto da fermentação láctica. Esses microrganismos realizam o processo de fermentação durante a anaerobiose, em que

degradam a glicose em dióxido de carbono (MALAJOVICH, 2009). A biomassa lignocelulósica é revestida de composto com celulose e hemicelulose, por isso, a biodigestão anaeróbia ocorre em processo de degradação lento, o que restringe a ação da hidrólise. Para auxiliar nesse processo de decomposição da biomassa são utilizados microrganismos com aptidão para fermentar pentoses e hexoses juntas no mesmo recipiente industrial, a sacarificação simultânea à co-fermentação (SSCF), a hidrólise e biodigestão de biomassa lignocelulósica (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Temperatura na faixa de 29°C e 45°C e pH entre 7,0 e 8,5 representam as condições ótimas de atividade lipolítica. A capacidade das linhagens de *Kluyveromyces* crescerem em altas concentrações de açúcares é uma característica almejada nos processos industriais, pois quanto maiores as concentrações de açúcares no mosto a ser fermentado mais elevada será a taxa de conversão em etanol e o rendimento da fermentação por reator, facilitando o processo de destilação, de acordo com Costa et al. (2014).

Estudos sobre o potencial fermentativo das leveduras têm sido desenvolvidos com estirpes isoladas de diversos ambientes. Cadete et al. (2012) a partir de coleta em região de Cerrado no Brasil, isolaram de madeira em decomposição leveduras do clado *Spathaspora*, com potencial para fermentar D-xilose. No norte do Brasil, Roraima, Cadete et al. (2012) coletaram em dois diferentes locais de Floresta Amazônica e isolaram representantes de cinco novas espécies: *Candida amazonensis* do clado *Scheffersomyces*, *Spathaspora* sp. 1, *Spathaspora* sp. 2, *Spathaspora* sp. 3, e *Candida* sp. 1 do clado *Spathaspora*. Dentre as cepas estudadas pelos autores *Spathaspora passalidarum* apresentou os maiores rendimentos de etanol em ensaios de fermentação com D-xilose, e *Candida amazonensis* maiores rendimentos de xilitol.

1.3.2 Taxonomia de leveduras

Na identificação e caracterização das leveduras são realizados testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. São mais de 90 testes e os resultados podem variar conforme o estado fisiológico do cultivo ou da variabilidade intraespecífica. De acordo com Kurtzman et al. (2011), as leveduras são identificadas pelo método convencional, onde são observadas as características macromorfológicas como: forma da colônia (esférica, oval ou alongada), cor (branca, creme, rosada, vermelha,

entre outras), margem (regular, irregular ou em forma de raízes), brilho (opaca ou brilhosa), superfície (lisa ou rugosa), consistência (cremosa, dura, esfarelada, membranosa ou seca) e elevação (plana, umbilicada ou convexa). Ainda de acordo com Kurtzman et al. (2011) e Yarrow (1998) essas características morfológicas auxiliam na definição do perfil, que são determinados por meio de testes fisiológicos e bioquímicos.

Dentre os testes fisiológicos e bioquímicos está a avaliação da capacidade de assimilação de compostos como fontes de carbono, onde as principais fontes são sacarose, celobiose e maltose, entre outras; a verificação do potencial fermentativo utilizando diferentes açúcares, tais como glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, entre outros; além dos testes de sensibilidade a pressão, temperatura máxima e mínima de crescimento, hidrólise de gordura, coloração pelo Diazonium Blue B (DBB) e a produção de urease, entretanto os testes bioquímicos são pouco sensíveis, podendo levar a uma identificação equivocada de leveduras (LACHANCE et al., 2001).

Além disso, em algumas leveduras, a observação de características micromorfológicas, como esporos, é muito difícil. Por isso associada a esta identificação as pesquisas atuais têm utilizado técnicas moleculares. O DNA ribossômico (rDNA) é o mais utilizado para identificação genética das leveduras por possuir partes muito conservadas intercaladas por outras partes variáveis. A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5.8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S (Figura 1). Esse último apresenta as sequências, menos conservadas, em comparação com o gene 18S e 5.8S, por isso uma região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados (HADZIAVDIC et al., 2014).

Figura 1 - Posição dos iniciadores no DNA ribossômico



A região D1/D2 do gene 26S rDNA tem sido empregada para diferenciar quase todas as espécies de leveduras estudadas, segundo Kurtzman e Robnett (1998), sendo necessário o sequenciamento conjunto com a região ITS para diferenciar espécies de leveduras com afinidade basidiomicéticas (SCORZETTI et al., 2002), complementando assim a identificação taxonômica, identificando e diferenciando linhagens de uma mesma espécie, e com isso ampliando o conhecimento da diversidade genética desses microrganismos. Além de identificar é essencial conhecer o potencial biotecnológico, como a capacidade de tolerar vários estresses, um dos importantes critérios para selecionar uma linhagem que seja eficiente no processo fermentativo (ZHAO; BAI, 2009).

O DNA extraído das leveduras é amplificado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), e posteriormente sequenciado, de acordo a metodologia de Sanger et al. (1977), utilizando os iniciadores NL1 e NL4 propostos por O'Donnell (1993) e os iniciadores ITS1 e ITS4 propostos por White et al. (1990).

1.4 USO BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS

Atualmente a aplicação de biocompostos microbianos em vários ramos da indústria, como, por exemplo, biocombustíveis, papéis, farmacêuticos e químicos agrícolas estão em franca expansão. As leveduras predominam nestes ramos como produtoras de enzimas, com grande destaque na indústria de alimentos, devido a maioria das espécies não apresentarem propriedades patogênicas. Cepas de leveduras com potencial industrial deverão ser capazes de responder rapidamente às condições de estresse no processo de fermentação, onde as temperaturas são elevadas. Contudo, adaptando-se aos fatores ambientais adversos por meio de ajuste de suas atividades metabólicas visando diminuir a perda substancial de sua viabilidade (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001).

A exploração e a produção de combustíveis renováveis ampliaram a utilização destes microrganismos, usando tecnologias sustentáveis para o aumento da produção de etanol, sem ampliar a área desmatada para o plantio de cana, usando o resíduo lignocelulósico do bagaço da cana-de-açúcar. Este material rico em celulose, hemicelulose e lignina é submetido a um pré-tratamento anterior às fermentações para produção de etanol de segunda geração (MAMEDE; PASTORE, 2004). *S. cerevisiae* predomina no processo de fermentação alcoólica, por possuir a habilidade de hidrolisar sacarose, presente no caldo da cana, em glicose e frutose, pelo seu alto rendimento fermentativo, mesmo na presença de oxigênio, e por ser mais tolerante ao etanol se comparada com outras leveduras, de acordo com Sanchez e Cardona (2008).

Segundo Rodrigues e Sant'anna (2001), as leveduras utilizadas industrialmente em processos fermentativos de pães, cervejas e vinhos apresentam linhagem com potencial biotecnológico diferente para a produção de etanol. Através da comparação entre os perfis genéticos das amostras de fermento foi possível entender se os padrões encontrados são os mesmos que foram introduzidos no início da safra ou se as linhagens selvagens predominaram ao longo do tempo.

Para Silva et al. (2004) utilizar leveduras em grande escala proporciona a obtenção de altas concentrações de enzimas, além da flexibilidade na manipulação genética em vários processos biotecnológicos. Este grupo de microrganismos possuem ótimas condições de cultivo, fácil e rápida triagem, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso.

1.4.2 Produção de etanol

A produção de etanol a partir da matéria lignocelulósica depende de um biocatalisador para fermentar hexoses e pentoses sob as condições adversas do ambiente industrial. A levedura *S. cerevisiae* possui essa capacidade de fermentar hexoses com rapidez e eficiência, tolera altas concentrações de etanol, inibidores e o baixo pH dos tanques de fermentação (STAMBUK et al., 2008).

Os resíduos de material lignocelulósicos são utilizados principalmente pela indústria para obtenção de açúcares fermentescíveis existentes na sua estrutura.

Esse processo ocorre por meio da hidrólise ácida diluída, onde são liberadas as pentoses (xilose, arabinose) e hexoses (glicose, manose e outras) componentes da celulose e hemicelulose.

O bagaço de cana-de-açúcar possui uma grande quantidade de xilose, 80% do total de açúcar na fração hemicelósica. A agroindústria utiliza o bagaço e o melaço para produção de resinas, plásticos e etanol (BRANCO et al., 2011). De acordo com a pesquisa de Cadete et al. (2012), uma estirpe de *Spathaspora brasiliensis* foi isolada de madeira apodrecida em ambientes de floresta em Roraima, foi descrita com potencial para fermentar D-xilose. Esse potencial para fermentar hidrolisados de plantas, tem despertando grande interesse nas indústrias de biocombustíveis.

Visando identificar novas leveduras termotolerantes, resistentes a altas temperaturas nas dornas de fermentação, para os processos de SSF, novas pesquisas estão sendo realizadas utilizando biomassa. Costa et al. (2014) utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar para o processo de SSF e na fermentação foram incluídas linhagens de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* em variações de temperaturas acima de 45°C. Os resultados afirmaram que as duas linhagens são capazes de fermentar as pentoses D-xilose e L-arabinose na temperatura de 45°C, confirmando essa característica para a linhagem de *Kluyveromyces*. Apesar dos maiores rendimentos terem ocorrido em temperaturas mais baixas, é imprescindível e desafiador novas pesquisas para intensificar esforços visando prospectar novas linhagens com o potencial biotecnológico almejado.

1.5 UTILIZAÇÃO DE FONTES RENOVÁVEIS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Muitos alimentos consumidos diariamente têm em sua composição algum tipo de produto de fermentação, como por exemplo, o iogurte que é produzido pela fermentação láctica, onde as bactérias chamadas de lactobacilos produzem ácido láctico. O pão e a cerveja são produzidos pela fermentação alcoólica, realizada por fungos anaeróbicos facultativos que produzem no final álcool. As acetobactérias produzem vinagre por meio da fermentação acética, que ocorre por uma reação química de oxidação parcial do álcool etílico, para a obtenção do ácido acético, conforme se lê em Ramos et al. (2011). Outra importância da fermentação, de acordo

com Penteado (2007), ocorre durante o processo de compostagem, potencializando-o, onde o microrganismo é inoculado no composto, em seguida ocorre a fermentação, visando um produto uniforme, com qualidade, com o mínimo de perdas dos nutrientes e sem o efeito de substâncias tóxicas. Os actinomicetos, fungos e bactérias, são obtidos comercialmente com sucesso, para aplicações comerciais de biodegradação da celulose, hemicelulose e lignina de difícil decomposição no ambiente natural.

Os estudos relacionados com a fermentação estão voltados principalmente para produção de etanol. Este produto é uma alternativa para diminuir impactos no meio ambiente, devido a exploração contínua dos combustíveis fósseis, melhorar a qualidade de energia, reduzindo o preço, e a poluição. No Brasil encontram-se condições favoráveis para a produção de etanol de primeira geração, principalmente pelos investimentos na tecnologia de transformação, que possibilita uma liderança na agricultura para geração de energia como cana de açúcar e milho, abastecendo assim o mercado de biocombustíveis, reduzindo a área desmatada e investindo em áreas destinadas à produção de alimentos, além de diversificar matérias-primas em diferentes biomas (STAMBUK et al., 2008).

A matriz energética brasileira é um exemplo de sustentabilidade, pois enquanto a média mundial é o uso de apenas 14% de fontes renováveis, o Brasil utiliza 46,8%. De fato, a cada ano mais de 40 milhões de toneladas de material vegetal não comestível, incluindo palhas de milho e trigo e restos de madeira são produzidos e geralmente descartados no ambiente. A transformação desses resíduos agrícolas que não serão utilizados para a produção de etanol de segunda geração, tem se mostrado bastante atrativa (SANDERSON, 2011).

Críticas à produção de etanol no Brasil são referentes à baixa eficiência e problemas ambientais em virtude do cultivo da cana-de-açúcar. Porém o avanço das pesquisas na produção de etanol no país elevou-se aproximadamente 4% ao ano, e os custos têm sido reduzidos em cerca de 3% ao ano desde a introdução do Proálcool. Este fato ocorre devido às melhorias nas variedades de cana, técnicas mais adequadas de manejo, melhoria no processo industrial de fermentação, extração e destilação. Os processos de pré-tratamento são continuamente melhorados para beneficiar a hidrólise na biomassa lignocelulósica, como por exemplo, a explosão a vapor, um tipo de hidrólise física (LASER et al., 2002).

Os pré-tratamentos químicos também podem ser empregados no aperfeiçoamento da hidrólise de biomassa, sendo realizada, na maioria dos casos, a

hidrólise ácida com a utilização de ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fluorídrico ou ácido fosfórico. Porém, a hidrólise ácida proporciona o surgimento de compostos tóxicos no meio, provenientes da degradação de açúcares como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural. Esses compostos são formados a partir da desidratação de pentoses como a xilose (furfural) e de hexoses como a glicose (hidroximetilfurfural). Outra forma de hidrolisar a biomassa quimicamente é pela hidrólise alcalina utilizando NaOH ou amônia. Embora a eficiência da reação seja menor, a formação de compostos tóxicos que inviabilizem o processo fermentativo é reduzida (LEVANON, 2003).

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) pertencente à família das bromélias, subclasse das monocotiledôneas, é uma fruta tropical de grande demanda no mercado frutícola. Esse fruto tem grande aceitação pelo aroma e sabor, é apreciado em todo o mundo, possui vitaminas C, A e B1, sais minerais e grande quantidade de açúcares. Destaca-se das outras frutas tropicais pelo seu sabor característico e altos teores de açúcares, por esse motivo é apreciado em todo o mundo. A temperatura ótima para cultivar o abacaxi está entre 22°C e 32°C, o que permite sua distribuição por vários países do globo (PARENTE et al., 2014).

A propagação do abacaxi é vegetativa, por meio do uso de estruturas da planta adulta tais como coroa (brotação do ápice do fruto), filhote (brotação do pedúnculo, que é a haste que sustenta o fruto), filhote-rebentão (brotação da região de inserção do pedúnculo no caule ou talo) e rebentão (brotação do caule). O abacaxizeiro chega a medir um metro e meio de altura (CRESTANI et al., 2010).

No Brasil, segundo maior produtor mundial, o abacaxi encontra ótimas condições para seu desenvolver, por essa razão é cultivado na maioria dos estados brasileiros. Em Roraima, a maior plantação de abacaxi está localizada no município de Cantá, abastecendo o consumo do estado e garantindo renda da população local, sendo que a produção de abacaxi ocorre durante o ano todo (IBGE, 2013).

Em Roraima o abacaxi vem sendo cultivado há alguns anos. Com o passar do tempo a área plantada aumentou de 101 hectares em todo estado, nos anos 90, para 70 hectares em 2016 apenas no município do Cantá, com produção de 45 toneladas. Neste município é realizado a “Festa do Abacaxi” para comemorar a fartura da produção. Outros municípios do estado como, por exemplo, Alto Alegre, Amajari e Normandia, também produzem esse fruto (ALBUQUERQUE et al., 2010).

O suco de abacaxi possui uma quantidade significativa de acidez, por esta razão é uma fonte alternativa na produção de fermentados, possibilitando condições ideais tanto para o mosto quanto para o desenvolvimento de leveduras, além de atribuir ao produto do mosto um sabor ácido. A produção de bebidas fermentadas é uma alternativa para prospectar a produção de abacaxi, produto promissor devido à aceitação em pesquisas de consumo, além de contribuir para a redução de perdas pós-colheita desses frutos. Tanto a casca como o cilindro central do abacaxi são consideradas boas fontes de fibra alimentar, de celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, as duas partes do fruto são pobres em pectina. A casca em comparação com o cilindro central apresentou maiores teores de todos os constituintes da fibra alimentar (PARENTE et al., 2014). Porém não há destinação adequada para a casca de abacaxi, tornando-se resíduos e poluindo o ambiente, além de ser um desperdício de uma ótima fonte de carbono.

Botelho, Conceição e Carvalho (2002) em pesquisa utilizando tanto o cilindro central como a casca, classificaram o fruto como uma boa fonte de fibra alimentar em termos de Fibra Detergente Ácido (FDA), Detergente Ácido (FDN), celulose, hemicelulose e lignina. A casca apresentou os maiores teores de todos os constituintes da fibra alimentar de FDA, FDN, lignina, celulose, hemicelulose além da pectina, em relação ao cilindro central.

2 OBJETIVOS

Para responder as perguntas norteadoras desta pesquisa foram formulados os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o potencial fermentativo de pentose de leveduras associadas ao trato intestinal de insetos aquáticos fragmentadores de detritos vegetais em igarapés roraimenses.

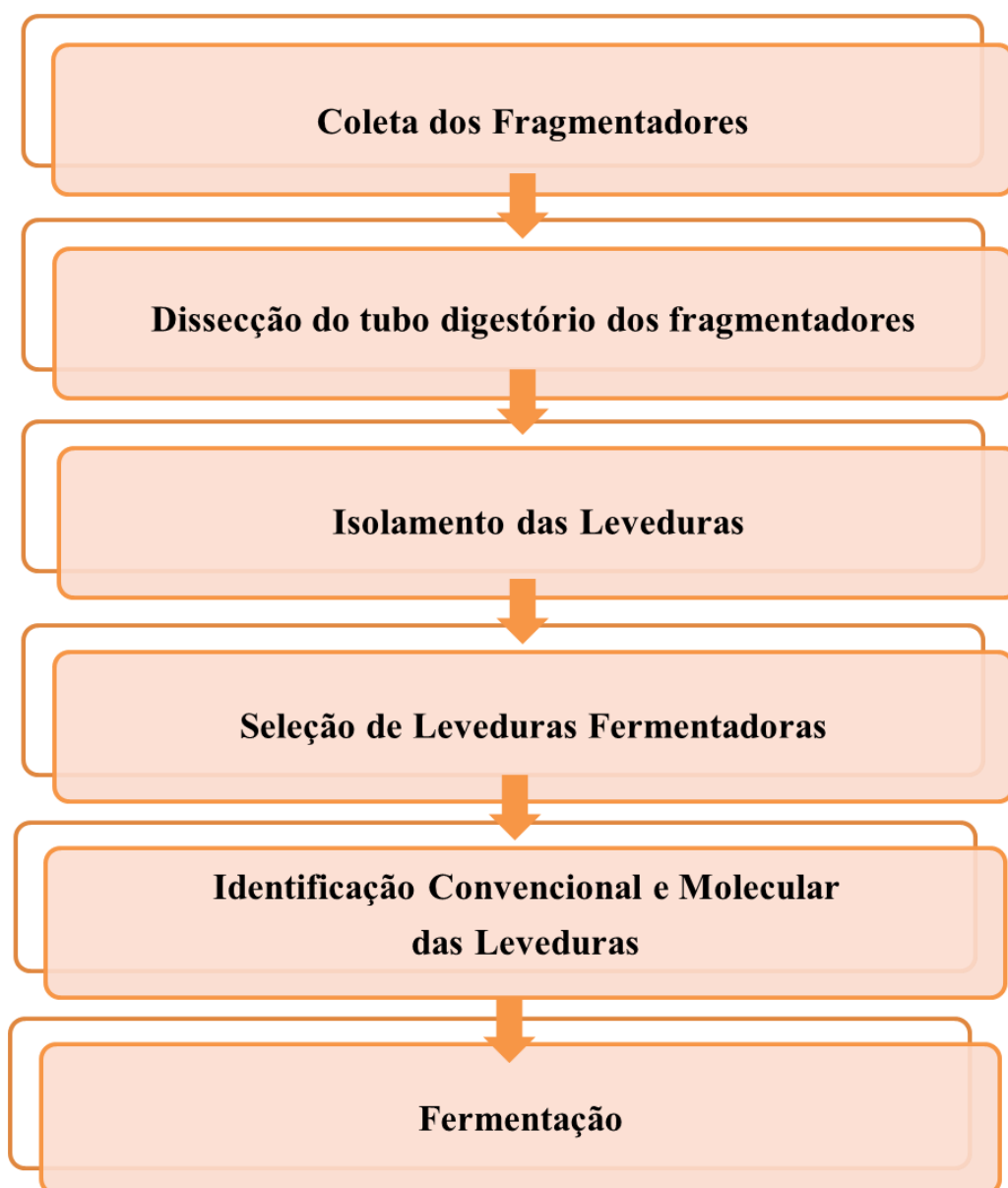
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as leveduras associadas ao trato intestinal dos insetos fragmentadores;
- Verificar o potencial das leveduras em fermentar pentoses;
- Identificar os isolados fermentadores;
- Avaliar a produção de etanol a partir de hidrolisado da casca de abacaxi.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo seguiu o Protocolo Experimental - Isolamento de microrganismos do trato digestório de macroinvertebrados aquáticos (ALENCAR; BARROS; MORAES, 2016). Todos os procedimentos foram executados nos Laboratórios do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT, de acordo com o fluxograma de trabalho abaixo (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma das atividades realizadas nesta pesquisa.



Primeiramente, realizou-se uma coleta para capturar insetos fragmentadores dos gêneros *Stenochironomus*, *Phylloicus* e *Triplectides* no mês de Julho 2016, que compreende o período chuvoso na região da Serra do Tepequém, com a finalidade de analisar a associação com leveduras, visando aplicações biotecnológicas. Após a coleta retirou-se o tubo digestório dos fragmentadores para o isolamento das leveduras, em seguida a seleção das leveduras fermentadoras, a identificação convencional e molecular. Por fim foram realizados os testes de fermentação com as leveduras potencialmente fermentadoras, utilizando a casca do abacaxi como fonte de carbono.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Roraima está localizado acima da linha do equador, com uma área territorial de 224.301,040 Km², dividido em 15 municípios, tendo Boa Vista como capital. As características do seu relevo são muito peculiares quebrando a monotonia de extensas áreas aplainadas. Assim como a formação de um mosaico de ecossistemas, veredas de buritizais e o lavrado. Dentre todas essas paisagens, o norte do estado é constituído de uma riqueza paisagística única, vinculadas aos testemunhos da história geológica como, mirantes, cavernas e cachoeiras, principalmente seus morros, montanhas e colinas bélicas (BARBOSA; COSTA E SOUZA; XAUD, 2005).

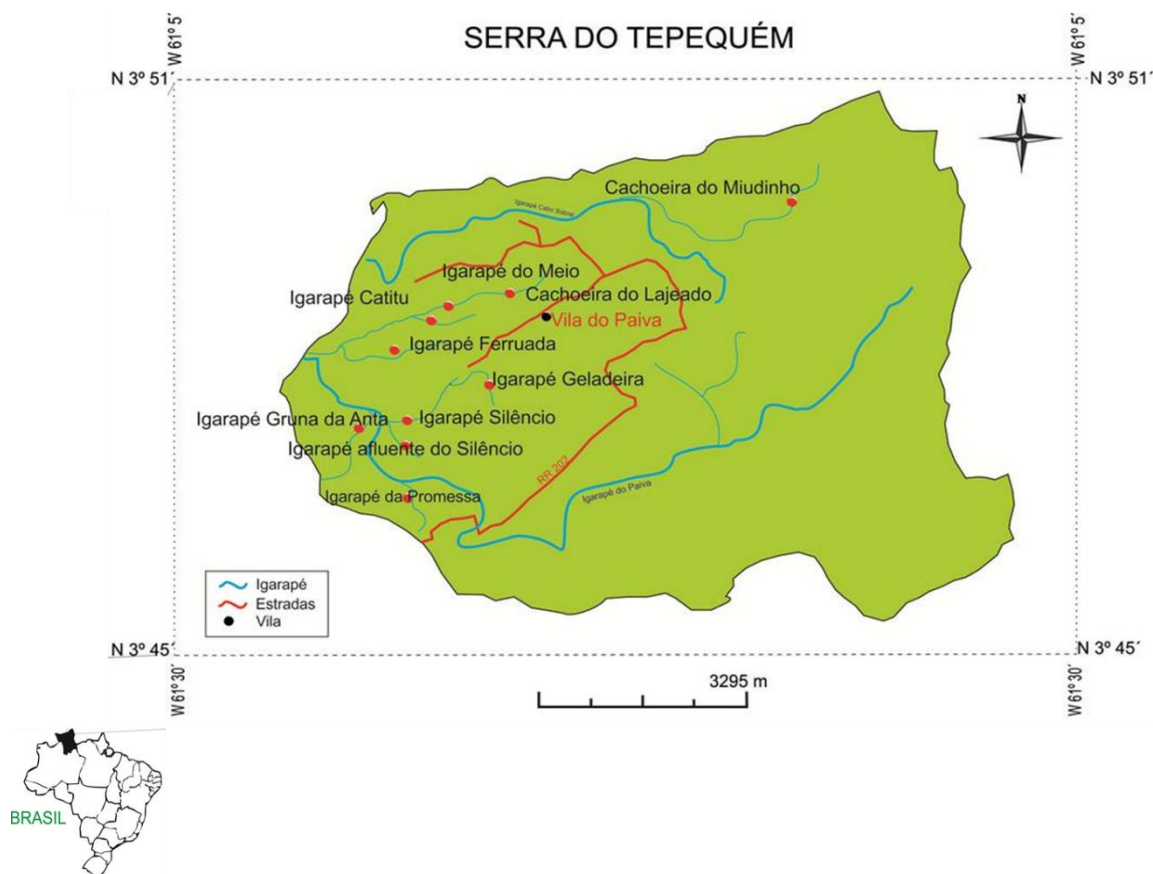
Dentre as belezas naturais do Estado, destaca-se a Serra Tepequém, que compreende uma área de 12.000 Km², situada no centro de uma bacia fechada com altitude de 550 a 1.100m, localizada no município de Amajari, distante a 210 Km de Boa Vista. A economia do município baseia-se na agricultura, pelo cultivo de milho, mandioca, banana, arroz entre outros. A pecuária predominante é a de corte, desenvolvendo também a piscicultura em área da mata, além do turismo. (ALBUQUEQUE et al. 2010; BESERRA NETA; TAVARES JÚNIOR, 2008).

A região é pólo turístico do Estado, onde encontram-se três grandes rios, Uraricoera, Parimé e Amajari, esse último dá nome à cidade. Por ser naturalmente uma área acidentada, favorece a formação de inúmeras lagoas, áreas encharcadas e inundáveis. Na Serra, além da fauna e flora exuberantes, as cachoeiras são a principal atração da localidade, sendo as cachoeiras do Funil, Paiva e Barata, as mais visitadas (ALBUQUEQUE et al. 2010).

3.2 AMOSTRAGEM

Foram selecionados 10 igarapés (Figura 3) para a coleta dos insetos fragmentadores dos gêneros de interesse para este projeto, dos quais foram isoladas as leveduras para avaliação da capacidade de fermentação de pentoses e posterior identificação taxonômica.

Figura 3 – Região da Serra do Tepequém no Estado de Roraima, em destaque os dez igarapés selecionados para coleta de insetos fragmentadores.



O percurso total entre os pontos de coleta correspondeu a aproximadamente 50km de caminhada. Os igarapés selecionados foram codificados com a primeira letra do estado de Roraima, uma vez que o projeto maior abrange dados de 4 estados, e a ordem de realização das coletas (Tabela 1).

Tabela 1 – Pontos e denominações dos igarapés onde foram coletados os insetos fragmentadores, na Serra do Tepequém – RR.

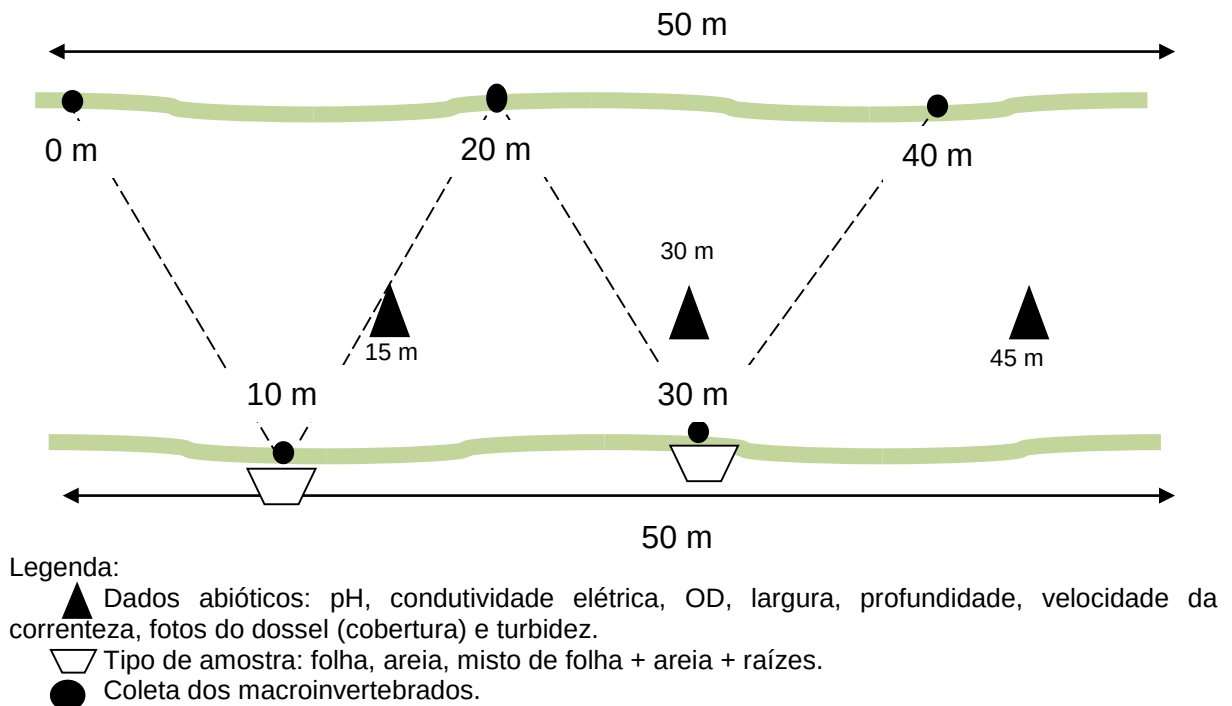
Pontos	Igarapés
R1	Grana da Anta
R2	Miudinho
R3	Promessa
R4	Afluente do Silêncio
R5	Silêncio
R6	Geladeira
R7	Ferroada
R8	Do meio
R9	Catitu
R10	Lajeado

3.2.1 Coleta de insetos fragmentadores

A coleta dos macroinvertebrados para isolamento fúngico foi realizada no mês de Julho de 2016, em expedição composta por membros do projeto maior. Para coletar nos dez igarapés a equipe permaneceu 12 dias na área de estudo percorrendo os pontos à pé e em veículo automotor, em alguns trechos. Foram coletados insetos fragmentadores aquáticos em margens alternadas de dez igarapés de primeira e segunda ordem, em um trecho de 50m (Figura 4), com distâncias de 10m entre os subpontos.

Utilizou-se a rede rapiché para auxiliar na coleta dos insetos fragmentadores dos gêneros *Stenochironomus*, *Phylloicus* e *Triplectides*. Desses três gêneros, foram coletados cinco espécimes de cada ao longo de cada igarapé. Foram coletados espécimes de *Stenochironomus* no último estágio de desenvolvimento (em média 18 mm de comprimento), enquanto que os espécimes de *Phylloicus* e *Triplectides* foram coletados com tamanhos superiores a 1,5cm.

Figura 4 – Esquema geral de coleta de insetos fragmentadores em igarapés.



Anteriormente à coleta dos fragmentadores, foram obtidos os dados abióticos do ambiente e a coleta dos tipos de substratos presentes no local: folhas, areia e misto de folhas, areia e raízes. Esses procedimentos foram realizados por outros membros da equipe do projeto maior. Após a coleta dos dados abióticos, procedeu-se a coleta dos macroinvertebrados com a rede rapiché, onde foram coletadas folhas submersas nas águas, observadas e analisadas em bandejas de plástico, para a seleção das folhas colonizadas por insetos fragmentadores do gênero *Stenochironomus*, ou casulos (abrigos) com larvas de insetos *Phylloicus* e *Triplectides*.

Posteriormente à retirada dos insetos fragmentadores, os espécimes foram submetidos a desinfecção superficial, onde foram retirados das folhas com auxílio de uma pinça estéril e mergulhados em tubo eppendorf com 1mL de álcool 70% por 30 segundos, em seguida foram retirados do álcool e transferidos para outro eppendorf com 1 mL de água destilada estéril, onde foram armazenados e transportados em isopor com gelo até o laboratório para a realização dos procedimentos micológicos, visando o isolamento fúngico. Cada eppendorf foi identificado com o ponto da coleta, data, gênero e numeração (1 a 5) correspondente aos 5 insetos coletados por gênero (ALENCAR; BARROS; MORAES, 2016).

3.2.2 Dissecção dos insetos fragmentadores

Em laboratório, foram selecionados três espécimes dos cinco coletados de cada um dos três gêneros, a seleção se deu pela observação dos insetos mais bem conservados ao chegar no laboratório. Os insetos foram retirados dos eppendorfs e transferidos para placas de Petri estéreis. Em seguida, com auxílio de uma lupa, foram dissecados utilizando pinças e agulhas estéreis para retirar o aparelho digestório que foi transferido para outro eppendorf contendo 1 mL de água estéril. Por fim, o aparelho digestório foi homogeneizado para a realização dos procedimentos de isolamento das leveduras, de acordo com o Protocolo do Projeto da Rede Bionorte (ALENCAR; BARROS; MORAES, 2016).

3.3 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO

Os procedimentos micológicos compreenderam os processos de dissecação dos insetos fragmentadores, isolamento dos fungos do aparelho digestivo dos insetos, contagem de todas as colônias crescidas em placas, obtenção de cultura pura e preservação das leveduras e seleção das leveduras fermentadoras para posterior teste da capacidade fermentativa e identificação taxonômica.

3.3.1 Isolamento das leveduras

Após a homogeneização do aparelho digestório em 1 mL de água estéril, foram retirados 100µL do homogeneizado e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (ágar batata dextrose) acrescido com 0,2 g/L de Cloranfenicol, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa BOD, com temperaturas de 28°C por um período de 3 a 15 dias.

3.3.2 Contagem das leveduras

Foi realizada a contagem de todas as colônias de leveduras crescidas nas placas identificadas com códigos de procedência dos igarapés, a referência do ponto de coleta e sigla do gênero do macroinvertebrado. Para cada tipo de colônia macromorfolologicamente diferente foi dado um código de identificação utilizando a letra inicial do estado, o número do igarapé, a letra inicial do gênero, a letra do macroinvertebrado e a numeração do fungo em ordem crescente. Ex.: R4SAL1 = a codificação da amostra de Roraima, do igarapé 4, do gênero *Stenochironomus*, indivíduo A e a primeira levedura contada na placa inicial. Após a contabilização foram obtidas as culturas puras dos isolados.

3.3.3 Obtenção da cultura pura

Para obtenção da cultura pura, as colônias de leveduras foram transferidas para placas contendo meio de cultura Ágar GYMP. Em seguida, foi realizado o registro das características macromorfológicas, onde as colônias foram fotografadas (frente e

verso) e as características gerais anotadas em planilha para posterior preservação e depósito na Coleção de Cultura de Microrganismos do PRONAT/UFRR.

3.3.4 Preservação das leveduras

As leveduras foram preservadas por dois métodos: criopreservação e sob óleo mineral. Por criopreservação as leveduras foram cultivadas em caldo GYMP (glicose 2%; extrato de levedura 0,5%; extrato de malte 2%; fosfato de sódio monobásico 0,2%) por 48 horas e congelados a -80°C com acréscimo de 20% de Glicerol (WOLFE; BRYANT, 2001). Por óleo mineral, as cepas foram repicadas em Ágar GYMP inclinado, após o crescimento das colônias foram cobertas com óleo mineral estéril. Em seguida, as leveduras foram devidamente codificadas e depositadas na coleção do Laboratório de Microbiologia do PRONAT – UFRR.

3.3.5 Seleção das leveduras fermentadoras

Para a seleção das leveduras fermentadoras, foram realizados testes em caldo YP (extrato de levedura 1%, peptona 2%) acrescido com 2% de glicose para a formação de um meio basal de fermentação (MBF). Nos tubos de ensaio foram utilizados tubos de Durham invertidos para a captação das bolhas durante o processo de fermentação. As leveduras inoculadas no meio foram incubadas a 25°C sob agitação a 100 rpm. As amostras foram retiradas para avaliação após 12 horas de incubação e a leitura realizada pela observação do crescimento e fermentação em meio líquido. O crescimento foi avaliado pela turvação do meio de cultura e a fermentação foi observada pelo tamanho de bolhas formadas dentro dos tubos de Durham. Bolhas com tamanho a partir do meio do tubo de Durham foi considerado fermentação forte, menor que a metade do tubo considerou-se fermentação, apenas uma pequena bolha estimou-se fermentação fraca e a ausência de bolha no tubo de Durham foi resultado de ausência de fermentação. Avaliou-se também a fermentação em MBF com xilose, galactose, melibiose e maltose, nas mesmas condições anteriores para a construção do perfil fermentativo dos microrganismos, os quais

foram classificados de acordo com o tamanho da bolha formada dentro do tubo de Durham.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

A identificação das leveduras foi realizada utilizando as técnicas de identificação convencional, por meio de testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, além de técnicas de identificação molecular, por meio de sequenciamento dos domínios D1 e D2 do gene 26S e da região ITS do rDNA.

3.4.1 Identificação convencional

A identificação convencional das leveduras ocorreu no laboratório de Microbiologia do PRONAT, onde foram realizados os testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, seguindo os padrões descritos por Kurtzman et al. (2011) Lachance et al. (2001) e Yarrow (1998).

3.4.1.1 Testes morfológicos

Nos testes morfológicos foram observadas as características macromorfológicas e micromorfológicas das leveduras. Macromorfolologicamente foram observadas nas colônias com auxílio de um estereoscópio (lupa): a cor (branca, creme, rosada, vermelha, etc.), o brilho (opaca ou brilhosa), a forma (esférica, oval ou alongada), a margem (regular, irregular ou em forma de raízes), a superfície (lisa ou rugosa), a elevação (plana, umbilicada ou convexa) e a consistência (cremosa, dura, esfarelada, membranosa ou seca). Enquanto que micromorfolologicamente foram avaliadas as células pelo preparo de lâminas a fresco de culturas recentes, observadas ao microscópio óptico com aumento de 400 a 1000 vezes. Foram observadas características celulares como: a forma celular (circular, oval, cilíndrica, fusiforme, apiculada), presença de pseudo-micélios, tipo de reprodução: assexuada (brotamento e/ou fissão) e tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar).

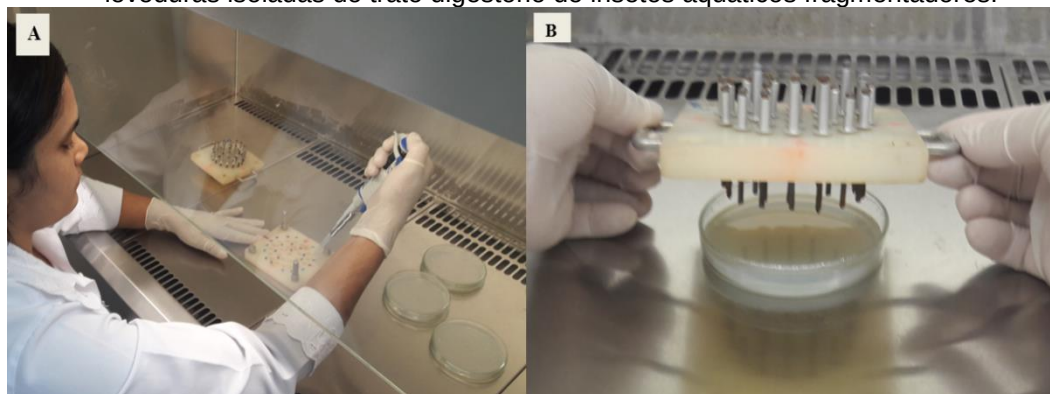
3.4.1.2 Testes fisiológicos e bioquímicos

Para a avaliação do perfil fisiológico e bioquímico dos isolados foram realizados testes de fermentação, tolerância, assimilação em diferentes fontes de carbono, nitrogênio, produção de urease e reação ao corante Azul de Diazônio Blue B (DBB). No teste de fermentação foram utilizados 100 µL do pré- inóculo, padronizado pela escala 2,0 de Macfarland que corresponde a 10^8 células de leveduras/mL, em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos contendo Meio Basal para Fermentação (MBF) com Glicose (glicose 2,0%; peptona 0,75%; extrato de levedura 0,45%), mantidos a 25°C por 21 dias, com leituras no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º dias após a inoculação. A leitura ocorreu pela visualização de bolhas de gás no interior dos tubos de Durham. Como controle negativo tubos ausentes de inóculos foram incubados paralelamente (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000).

A assimilação a diferentes fontes de nitrogênio e carbono, os testes de DDB e os testes de temperatura e tolerância foram avaliados pela técnica de réplica-plate, onde até 25 isolados podem ser testados de uma só vez, através de multinoculador semelhante a um carimbo (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000). Para essa técnica, foi realizada a suspensão das células dos isolados, em seguida distribuídos 500µL, padronizados a 10^8 células de leveduras/mL na escala de Macfarland, em poços distintos do carimbo. Após isto, com a parte superior do carimbo contendo os pinos, os inóculos foram semeados nas placas de Petri, previamente preparadas com os meios a serem testados (Figura 5).

Nos testes de assimilação a diferentes fontes de nitrogênio foram utilizados: Nitrito (ágar 2%; Yeast Carbon Base 1,17%; nitrito de sódio 0,026%); Nitrato (ágar 2%; YCB 1,17%; nitrato de potássio 0,078%) e Lisina (ágar 2%; YCB 1,17%; lisina 0,076%); como controle negativo foi utilizado YCB branco (ágar 2%; YCB 1,17%) e incubação a 25°C por 21 dias, com leituras no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º dias após a inoculação.

Figura 5 – Procedimento para determinação do perfil fisiológico e bioquímico de leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores.



Legenda: A- distribuição do inóculo nos poços do carimbo; B- placa de Petri sendo inoculada.

Nos testes de assimilação a diferentes fontes de carbono foi utilizado o meio base (ágar 2,0%; YNB 0,67%) para acrescentar cada um dos 34 açúcares/fontes de carbono: Glicose, Galactose, L-sorbose, Maltose, Sacarose, celobiose, Trealose, Lactose, Melibiose, Rafinose, Melizitose; Amido solúvel; D-xilose L-arabinose; D-arabinose; D-ribose; L-ramnose; Etanol; Glicerol; Eritritol; Ribitol (adonitol); D-manitol; D-sorbitol; Salicina; Succinato; Citrato de sódio; M-inositol; Metanol; Hexadecano; Xilitol; Acetona; Etilacetato; Isopropanol. Como controle negativo foi utilizado YNB branco (ágar 2,0%; YNB 0,67%), e incubação a 25°C por 21 dias, com leituras no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º dias após a inoculação.

A avaliação de crescimento das leveduras em diferentes temperaturas foi realizada pela inoculação dos isolados em meio Sabouraud (glicose 2,0%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2,0%) e incubação nas temperaturas: 37°C, 40°C, 42°C e 45°C, com leituras pela observação de ausência ou presença de crescimento de colônias após 24 e 48 horas.

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%; CaCO₃ 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%) e incubação a 25°C por 21 dias, com leituras no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 14º e 21º dias após a inoculação.

Para testar a produção de urease, os isolados foram inoculados em caldo ureia (Urea Broth), incubados a 37°C por 72 horas, a cada hora era observada a mudança ou não da cor para vermelho, indicando a atividade de urease, de acordo com Maldonade, Scamparini e Rodrigues-Amaya (2007).

O teste de reação ao corante DBB foi realizado segundo o método de Hagler e Mendonça-Hagler (1991), onde os isolados foram inoculados em meio com urease, incubadas a 55°C. Sobre as colônias adicionaram-se gotas do reagente DBB (15mg de DBB em 15 mL de tampão TRIS 0,1 M pH 7). As colônias que apresentaram coloração vermelha foram consideradas positivas para Basidiomicetos, as demais, consideradas como negativas foram relacionadas aos Ascomicetos.

Após os testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, os dados foram comparados à chave de identificação para caracterizar as leveduras isoladas em nível de gênero e espécies (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000).

3.4.2 Identificação Molecular

Para complementar a identificação convencional foi extraído o DNA das leveduras isoladas, amplificado as regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2), com os iniciadores ITS1/ITS4, o sequenciado foi realizado de acordo com o método de Sanger et al. (1977). Os procedimentos foram todos realizados nos laboratórios de Biologia Molecular do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT e Centro de Estudos da Biodiversidade – CBio.

3.4.2.1 Extração total do DNA

As leveduras selecionadas foram inicialmente cultivadas em meio de cultura GYMP (Extrato de Levedura 0,5%, Extrato de Malte 1%, Glicose 2%, Fosfato de Sódio Monobásico 0.2%, Ágar 2%). Após cinco dias de crescimento retirou-se duas alçadas de colônia das leveduras depositando-as em microtubos de 2 mL, em seguida foram armazenadas a -20°C por um período mínimo de 12h.

Para a extração do DNA seguiu-se o protocolo de De Hoog et al (2005) com modificações, onde as leveduras foram colocadas em cadinhos estéreis e congelados para macerar até homogeneizar, em seguida adicionou-se 400 µL de tampão de lise

(Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 1 M; SDS a 1%). Transferiu-se o material do cadinho para um microtubo de 2 mL, acrescentando 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL), homogeneizou-se em vortex por 30 segundos, logo após foram incubados em banho Maria a 60°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 162 µL de solução CTAB (Tris-HCl 2 M, NaCl 8,2%, EDTA 2 M, CTAB 0,2%), homogeneizou e incubou novamente em banho Maria por 10 minutos a 65°C. Posteriormente adicionou-se 600 µL de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) misturando suavemente o material, com o objetivo de remover os resíduos celulares como proteínas e lipídios, a seguir foram incubados a -20°C por 30 minutos para acelerar a precipitação dos resíduos.

Após isso, centrifugou-se a 13.200 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL, acrescentou 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M para purificação do DNA, misturou-se suavemente e incubou-se a -20° C por 30 minutos, a seguir foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e adicionados 50% do volume de isopropanol e incubado a 4°C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado por inversão e foram adicionados 200 µL de etanol (gelado) 70%. Homogeneizou-se a amostra gentilmente, logo após centrifugou-se a 13.200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão. Por fim, os microtubos foram colocados abertos invertidos sobre papel toalha limpo por 30 minutos ou tempo suficiente para evaporação total dos resíduos de etanol, em temperatura ambiente. Para ressuspender o DNA foram adicionados 100 µL de água ultra pura ao microtubo, logo após incubados a 4°C por até 12 h para completa hidratação do DNA. Após esse período adicionou-se 5 µL de RNase, incubou-se por uma hora a 37°C em banho Maria, com a finalidade de eliminar o RNA presente. Em seguida armazenou-se a -20°C até o momento da utilização.

A concentração de DNA foi avaliada em espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific), a pureza determinou-se pela razão entre 260/280 nm, utilizando os comprimentos de onda de 260 nm (concentração de DNA mg/mL = Abs x fator de diluição (100) x 50) e 280 nm, referente a quantificação de proteínas. Já a integridade do DNA, foi visualizada por meio da eletroforese com agarose a 0,8%. Após solidificar o gel foi submerso em tampão TBE 1X e aplicados nos micropoços 1 µL do corante gel Red (1:500 Biotium), 2 µL de Azul de Bromofenol (1% de azul de Bromofenol e 5% de sacarose), 7 µL da amostra e 3 µL de Lâmbda (100µg/mL), a corrida foi mantida

com potência constante de 100 W por 1 hora. Finalizada a corrida, os géis foram visualizados sob luz UV (302 nm) e documentadas em fotodocumentador digital EasyDoc 200 para visualização das bandas.

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

No processo de amplificação dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do DNAr foram utilizados os conjuntos de iniciadores NL1 e NL4 NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAGGG 3') 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 MgCl₂, 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 H₂O 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.

Antes do 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 ressuspensão em 10 µL de água ultrapura. As amostras foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro (Termo Scientific) com programa Nanodrop-1000 V3.7.1.

Os amplicons foram submetidos a uma etapa de purificação, 45 µL de amplicons 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.

3.4.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1/ITS4

Para a amplificação e sequenciamento das regiões intergênicas, utilizou-se os iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGAACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3'). A reação de PCR foi conduzida com volume total de 25 µL, sendo 23 µL de mix (Tampão 10X (pH 8,5); 1,5 mM de MgCl₂; 1,0 mM de dNTP, 1 mM de iniciador ITS1; 1 mM de iniciador ITS4; 2,5 U de Taq DNA Polimerase (UNISCIENCE), H₂O s.q.p e 1,0 µL de DNA. Após homogeneizar a reação foi colocada em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial (95°C durante 3 minutos), desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (55°C por 45 segundos) extensão (72°C por 1 minuto) e alongamento final a 72°C durante 10 min. Com o objetivo de visualizar o produto da PCR foi realizado a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,2%. O gel foi submerso em tampão TBE 10X, onde foi adicionado 5 µL de amostra, 2 µL de tampão de carregamento (1% de azul de Bromofenol e 5% de sacarose) e 1 µL do corante gel Red (1:500), a corrida foi realizada a 100 W por 50 minutos, e posteriormente revelada em fotodocumentador digital EasyDoc 200 para visualização das bandas.

3.4.2.3 Sequenciamento

Após a amplificação dos fragmentos de DNA realizou-se a purificação com Polietilenoglicol (PEG) utilizando a metodologia recomendado por Lis (1980), onde dez μL do produto da PCR foram transferidos para microtubos de 0,5 mL e adicionado volume equivalente de PEG (20%), agitou-se em vortex por 10 segundos e incubou a 37° C por 15 minutos. Em seguida os microtubos foram colocados em centrífuga com a programação de 2.500 xg (6.105 rpm, Minispim, eppendorf) por 15 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante por inversão e adicionou 125 μL de Etanol 80% gelado, centrifugou-se a 145xg por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão e os tubos foram secos a 37°C por 15 minutos ou até observar a completa secagem.

Logo após esse período adicionou-se 5 μL de água livre de nuclease, submetidos a agitação em vortex por 10 segundos. As amostras foram levadas para freezer a -4°C por aproximadamente duas horas, para melhor eluição do DNA. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C até a etapa de precipitação dos fragmentos da PCR.

Para o sequenciamento foi utilizado o kit de Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem, EUA), onde o mix da reação teve um volume final de 832 μL (Quantidade por tubo: 0,5 μL Big Dye 3.1. O protocolo de sequenciamento seguiu instruções do kit, 1,75 μL de Buffer, 1 μL Primer S ou AS – 3,2 μM , e Água pura s.q.p.). Após homogeneizar foram aplicados 8 μL em cada poço da placa de sequenciamento, em seguida aplicou-se 1 μL dos primers ITS1 (Forward) e ITS4 (Reverse) e 1 μL da PCR, centrifugou-se por 5 minutos, logo após encaminhadas para o termociclador e submetidas aos ciclos: Incubação a 96°C por 1 minuto, Desnaturação 96°C por 15 segundos, Anelamento 50°C por 15 segundos, Extensão 60°C por 4 minutos.

Finalizada a reação no sequenciador, a placa foi retirada e foram adicionados 2,5 μL de EDTA a 125 mM pH 8, que atuou como quelante de íons antes da próxima etapa. Em seguida foram adicionados 30 μL de etanol 100%, vedou-se a placa e aguardou 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 45 minutos. Após isto, retirou-se a vedação da placa invertendo-a sobre papel absorvente, adicionou-se 30 μL de etanol a 70%, vedou a placa novamente e centrifugou-a por 15 minutos a 4°C, novamente inverteu-se a placa sobre papel absorvente até a secagem completa. Por fim, adicionou-se 10 μL de Formamida Hi-Di em cada poço da placa, em seguida foi aquecida em termociclador

a 95°C por 3 minutos, imediatamente colocada em gelo por alguns minutos até esfriar totalmente e colocá-la para o sequenciador. O sequenciamento ocorreu em aparelho automatizado de DNA ABI3500 Applied Biosystems™.

3.4.2.4 Análise das sequências

As sequências nucleotídeas foram editadas utilizando o programa Geneious e comparadas com as sequências de espécies conhecidas registradas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no portal NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) desenvolvido pelo National Center for Biothecnology (ALTSCHUL et al., 1997) mais especificamente o BLASTn (n= nucleotídeo). As que apresentaram maior similaridade com as sequências obtidas foram utilizadas na construção da árvore filogenética.

Para a análise das sequências foi utilizado o programa Geneious versão 5.5.4 (DRUMMOND et al., 2011), onde foram visualizadas, analisadas, editadas e combinadas para obter uma sequência consenso. Com este mesmo programa foi avaliada a qualidade das sequências, verificando o valor de QV (Quality Value), que sugere a qualidade das sequências. Para uma sequência ser considerada com boa qualidade, deve apresentar o QV menor que 20.

3.4.2.5 Análise Filogenética

Para análise filogenética das sequências dos isolados nesta pesquisa, foram utilizados representantes de outros gêneros de leveduras depositadas no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Utilizando o método de Máxima Verossimilhança ALRT, com base no teste estatístico do qui quadrado, para aceitar ou rejeitar a posição do braço, formando os nós (pontos de encontro). Para a configuração ML, mais conhecida, e o segundo melhor rearranjo NNI em torno do ramo de interesse (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006). Esse teste está relacionado com o teste do ramo interior previamente estudado para inferência da árvore de distância e verossimilhança, todos os valores acima de 0,5 são significativos.

3.5 FERMENTAÇÃO DE PENTOSE

Para fermentação de pentoses foram utilizadas estirpes das leveduras que apresentaram potencial fermentativo, conforme item 3.3.6. Para os testes foram utilizados resíduos lignocelulósicos de abacaxi como fonte de carbono (substrato).

3.5.1 Substrato

As cascas do abacaxi utilizado nesta pesquisa foram provenientes da feira do Produtor em Boa Vista-RR. Na feira, os abacaxis foram descascados utilizando facas, as cascas foram então armazenadas em sacos plásticos de 100 litros e transportadas para o laboratório de Microbiologia do PRONAT/UFRR. Foram coletados aproximadamente 90 kg de cascas do fruto para a obtenção da farinha. Em laboratório, as cascas foram separadas dos resíduos de polpa com auxílio de facas devidamente higienizadas. Depois de selecionadas, as cascas seguiam para estufa de ventilação forçada a 60°C por 48h, e por fim, trituradas em moinho de facas, com peneiras de 2 mm, até a consistência de farinha (Figura 6).

3.5.2 Obtenção do hidrolisado das cascas de abacaxi

Após a obtenção da farinha das cascas trituradas, foi realizado o delineamento experimental utilizando o programa Estatística 7.0, onde a melhor razão sólido:líquido foi de 1:3 [g/L]. As cascas foram reidratadas com água destilada estéril, por 24h em temperatura ambiente. Em seguida, foram autoclavadas por 40 minutos a 121°C, resfriadas em temperatura ambiente e filtradas com o auxílio de um filtro de papel uma bomba de vácuo. O volume do hidrolisado produzido foi mensurado em proveta e anotado. Por fim, realizou-se a verificação do pH do hidrolisado, com pHmetro digital Labmeter, corrigindo para o pH 5,0 conforme necessário, e realizada a quantificação dos açúcares redutores totais (ARTs) pelo método de Miller (1959).

Figura 6 –Procedimentos para a produção da farinha da casaca de abacaxi.



Legenda: A- Amostras; B- Separação; C- Secagem; D- Moagem e obtenção de farinha.

Para quantificar os açúcares redutores totais (ARTs) do hidrolisado foi preparada uma solução com DNS- Ácido 3,5-dinitro salicílico. Inicialmente, foram utilizadas 5g de xilose diluídas em 50 mL de água estéril. Posteriormente, foi diluída até a concentração 10^{-1} , após isso 20 μL da diluição da diluição 10^{-1} foram transferidos para eppendorf de 2 mL, em triplicata, onde foram acrescentados 180 μL de água estéril e 300 μL de DNS. Após isso, foram incubados a 100°C por cinco minutos para que os açúcares se quebrassem em monômeros e o DNS pudesse se ligar a eles. Em seguida foram adicionados 1500 μL de água estéril, para completar 2mL. O cálculo dos ARTs foi realizado pela equação da reta da curva padrão que foi previamente construída (APÊNDICE B). Os valores foram anotados para posteriormente calcular o rendimento de ARTs (R_{ART}) com a seguinte fórmula:

$$R_{\text{ART}} = [(C.V/W) \times 100]$$

Onde:

R_{ART} = Rendimento de ART

C = Concentração de ART

V = Volume recuperado do hidrolisado

W = Peso seco da farinha da casca de abacaxi

3.5.3 Preparação do inóculo para fermentação

Do total de 22 isolados testados foram selecionadas as seis leveduras com melhores resultados nos testes iniciais de fermentação. Para o pré-inóculo da fermentação, as leveduras selecionadas, com células metabolicamente ativas, foram inoculadas em 10 mL de caldo GYMP, em seguida padronizadas em absorbância 0,8 a 600 nm, para uma concentração de 15g de células de leveduras/L, incubadas sob agitação de 200 rpm a 28°C por 18h.

3.5.4 Fermentação

A fermentação alcoólica em fermentômetro foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de hidrolisado da casca de abacaxi (Figura 7). Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e selo de água, o que proporciona a saída de ar, mantidos a 28°C sob agitação a 200 rpm por 90 horas e pesados a cada 6 horas para acompanhar a perda de massa por desprendimento de CO₂.

Figura 7 – Avaliação da produção de etanol por levedura em Fermentômetro.



3.5.5 Determinação da concentração de etanol

Para determinar a concentração de etanol (teor alcoólico) foi realizado o monitoramento da produção de CO_2 via medida do somatório das massas perdidas por liberação do gás e acumulada durante sua liberação, utilizando o fermentômetro. Para a avaliação da concentração de etanol formado no sistema fermentativo, foi considerada a equação geral da fermentação alcoólica, onde 1 mol de glicose convertida tem como produtos finais em moles: $2\text{etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, havendo uma proporção entre a evolução de CO_2 e a concentração de etanol formado (DIJCK et al., 2000).

Estas medidas permitiram ainda, avaliar o crescimento celular, pois sendo o dióxido de carbono um produto terminal do catabolismo este reflete na geração de ATP. Havendo uma constância entre a massa de células geradas por mol de ATP, e uma correlação da produção de CO_2 com o crescimento das leveduras.

Para verificar o crescimento celular durante a fermentação, a biomassa final foi centrifugada a 14.000 rpm, com intervalos de cinco minutos até a total concentração da biomassa, retirando o sobrenadante e descartando. Em seguida, foram realizadas lavagens com água estéril para retirada de resíduos do hidrolisado. Após isto, a biomassa foi novamente centrifugada e colocada em estufa de ventilação forçada para

secagem, por fim foram realizadas pesagens até a obtenção do valor constante de biomassa seca.

3.5.6 Análise da produção de etanol

A evolução de CO₂ foi anotada e posteriormente tabulada para estimar a produção de etanol através do cálculo estequiométrico, com a seguinte fórmula:

$$X = [(mCO_2 \times 0,511)/0,489]$$

Onde:

mEtOH corresponde a massa de etanol produzido (g),

mCO₂: corresponde a massa de dióxido de carbono (g) desprendido durante o ensaio.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com os dados da produção de etanol, pela realização de uma ANOVA seguida do teste de Tukey (0,5%).

Na avaliação da fermentação de pentoses foi utilizado o programa BioEstat 5,0. Inicialmente foi realizada uma análise de variância – ANOVA, entre as médias dos índices e o teste de Tukey ($p < 0,05$) para verificar significativa diferença entre as variáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta dos insetos fragmentadores, foram isoladas e selecionadas leveduras com potencial fermentativo, identificadas convencional e molecularmente, e testadas quanto a fermentação alcoólica.

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS LOCAIS DE COLETA

Os igarapés da Serra do Tepequém selecionados para a coleta dos insetos fragmentadores apresentam características de leito entre arenoso e pedregoso, com pouco acúmulo de material vegetal como troncos, galhos e folhas. A largura dos igarapés variou entre 0,49cm e 5,94m, o mais estreito e o mais largo, respectivamente.

A profundidade variou entre 0,04 e 6,16m. Dentre os dados abióticos registrados, a temperatura média não variou muito entre os igarapés, a menor foi registrada no igarapé da Anta (23,26°C) e a maior nos igarapés Miudinho (25,33°C) e Silêncio (25,33°C).

O pH médio registrado na água foi ácido, com o menor valor (3,74) no Afluente do Silêncio e o maior (7,25) no igarapé Lajeado. A condutividade elétrica média foi menor no igarapé da Anta 0,62 mS/cm e maior no Miudinho 3,77 mS/cm. Houve diferença no oxigênio dissolvido nas águas dos igarapés com média variando entre 6,76 mg/L, no Afluente do Silêncio, a 12,12 mg/L no Lajeado. Todos os dados abióticos obtidos estão relacionados na Tabela 2.

As temperaturas das águas dos igarapés onde foram realizadas as coletas variaram entre 23,26°C de mínima a 25,33°C de máxima, esse resultado pode ter relação com a presença de vegetação, onde há vegetação mais densa, as temperaturas são menores; enquanto que em igarapés com menos vegetação, ou apenas arbustos, prevalecem as temperaturas mais elevadas (CALLISTO, GONÇALVES, GRAÇA, 2007).

A maior ocorrência de insetos aquáticos fragmentadores com leveduras no trato digestório foi proveniente de águas com 24,16°C, Igarapé do Meio, e 24,90°C, Igarapé Catitu (Tabela 2). Valores próximos da temperatura máxima encontrada nos igarapés, 25,33°C, e que corroboram com resultados encontrados por Fulan et al. (2009), que estudaram a influência dos parâmetros das águas de rios no sul do Brasil com

vegetação ciliar antropizada. Os autores encontraram uma correlação positiva entre a temperatura da água e a abundância de insetos aquáticos, também observado neste estudo.

Tabela 2 – Dados abióticos dos igarapés selecionados para coleta dos insetos fragmentadores na Serra do Tepequém-RR

IGARAPÉS	TEMPERATURA (°C)	pH	C. E(mS/cm)	O.D. (mg/L)
Da Anta	23,26	4,81	0,62	9,35
Miudinho	25,33	4,47	3,77	11,87
Promessa	23,53	4,63	2,53	11,58
Afluente do Silêncio	24,10	3,74	1,30	6,76
Silêncio	25,33	4,80	1,93	9,54
Geladeira	23,96	6,73	3,48	11,46
Ferroada	24,60	6,18	1,88	10,72
Do meio	24,16	6,51	1,84	11,93
Catitu	24,90	5,41	1,88	8,10
Lajeado	25,16	7,25	1,89	12,12

Legenda: C.E – Condutividade Elétrica, O.D. – Oxigênio Dissolvido.

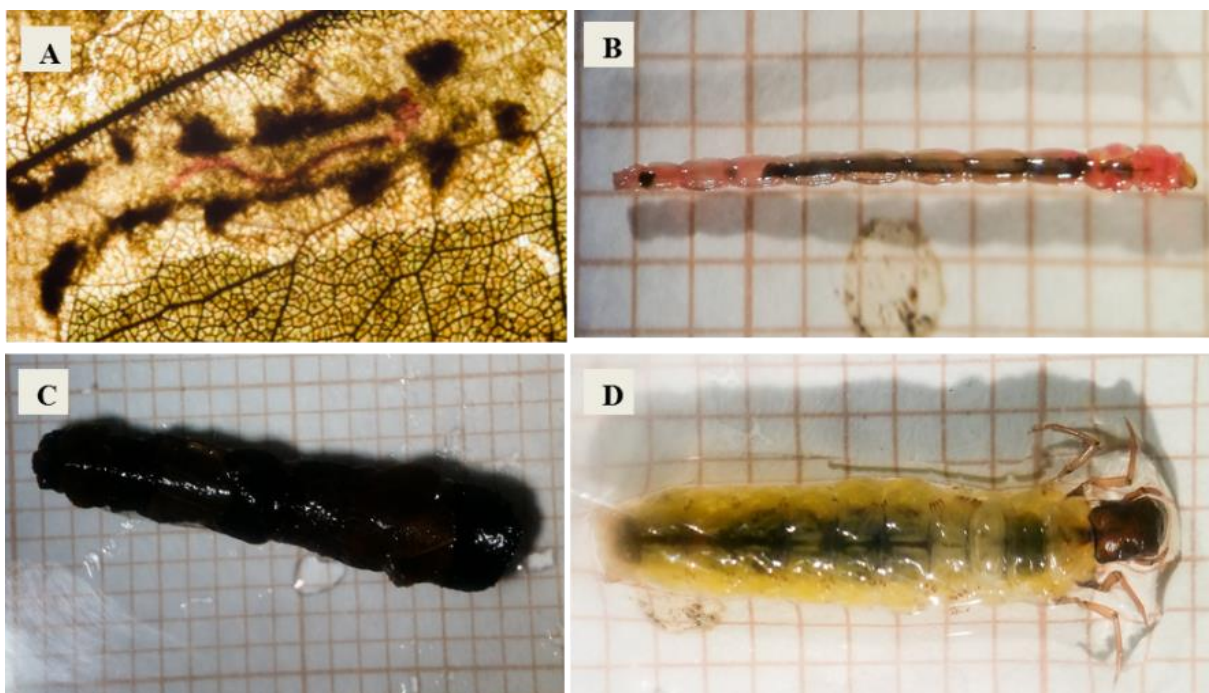
Outro parâmetro analisado foi a oxigenação da água, onde os valores de oxigênio dissolvidos nos igarapés variaram entre 6,76 e 12,12 mg/L. De acordo com Bezerra-Neto e Pinto-Coelho (2001), o oxigênio na água, principalmente de lagos, é um importante elemento químico, sendo um subproduto da fotossíntese efetuada pelo fitoplâncton e pelas macrófitas aquáticas, juntamente com a matéria orgânica presente nos extratos superiores e na região litorânea dos lagos e reservatórios. Esteves (1998), propôs que há uma influência direta da temperatura no oxigênio disponível na água, onde quanto menor a temperatura maior a oxigenação, devido ao consumo deste elemento durante o processo de decomposição de matéria orgânica e pela respiração de organismos aquáticos, o que reduziria a oxigenação no ecossistema. Os resultados obtidos no presente estudo diferiram desse trabalho, onde a temperatura da água não teve nenhuma influência no oxigênio dissolvido nos corpos hídricos analisados.

Em relação ao pH das águas coletadas foi encontrada uma correlação negativa com o número de insetos coletados, variando entre 3,74, considerado ácido, e 7,25, neutro. De acordo com Maier (1978), no Brasil os ambientes lóticos geralmente apresentam pH próximo da neutralidade. A condutividade elétrica não influenciou nos resultados.

4.2 INSETOS FRAGMENTADORES COLETADOS

Durante a coleta foram encontradas larvas de insetos fragmentadores dos gêneros *Stenochironomus* e *Phylloicus* (Figura 8). O terceiro gênero de interesse para essa pesquisa, *Triplectides*, não foi encontrado em nenhum dos igarapés selecionados. Isso pode ser explicado devido a uma forte estiagem que castigou o estado de Roraima em 2015, influenciando diretamente nos ambientes aquáticos da região da Serra do Tepequém. De acordo com Flint; Holzenthal; Harris (2001) as larvas de Trichoptera são sensíveis a mudanças climáticas e atividades antrópicas, sendo encontradas em ambientes aquáticos de água doce corrente.

Figura 8 – Larvas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém-RR.



Legenda: A = larva de *Stenochironomus* em minas na folha, B = larva de *Stenochironomus* sobre papel milimétrico, C = Abrigo de *Phylloicus*, D = larva de *Phylloicus*.

De acordo com Barbola et al. (2011), a ausência de vegetação ripária nas margens dos igarapés influencia diretamente na ocorrência de organismos coletores, principalmente Chironomidae, devido a baixa entrada de matéria orgânica nesse ambiente aquático. No Igarapé Geladeira, local de estudo desta pesquisa, esta

observação foi confirmada, pois onde havia pouca mata ciliar foram coletados um número menor de fragmentadores.

A quantidade de larvas de insetos coletados nesta pesquisa pode estar relacionada também com a flora destes ambientes que sofrem forte influência de fatores hidrológicos, químicos e físicos. Por exemplo, chuvas intensas e períodos prolongados de secas podem gerar uma repentina ou gradual modificação do habitat natural. Segundo Meybeck e Helmer (1992) as características e propriedades de um ambiente aquático dependem do solo, do clima, da vegetação e também da ação antrópica no local, sendo suscetíveis a variações temporais e espaciais em decorrência de processos internos e externos.

A fauna de um ambiente revela informações importantes, no que se refere a avaliação de parâmetros ecológicos, complementa os dados bióticos e abióticos de um ecossistema, onde as ações negativas são observadas através dos elementos físicos e biológicos (LEDESMA et al., 2013). Um exemplo disto pode ser confirmado em Boa Vista/Roraima, onde existem sete igarapés urbanos: Caranã, Caxangá, Frasco, Pricumã, Grande, Paca e Mirandinha, onde a maioria se encontra canalizado ou poluído, sendo incomum a presença da fauna aquática nesses ambientes devido a alteração dos dados abióticos, principalmente o pH e oxigênio dissolvido (ANDRADE, 2011).

A formação das comunidades lóticicas é influenciada diretamente pelo estresse hídrico e a geologia do local. Em Roraima houve um grande período de estiagem em 2015, podendo justificar a baixa ocorrência de insetos fragmentadores das ordens Diptera e Trichoptera no momento da coleta desta pesquisa. Foram coletados insetos em nove dos dez igarapés selecionados. O gênero *Stenochironomus* foi encontrado nos nove igarapés: Anta, Promessa, Afluente do Silêncio, Silêncio, Geladeira, Ferroada, Do meio, Catitu, Lajeado, no total de 27 insetos. A principal semelhança entre eles está na presença da mata ciliar e o baixo nível de antropização, além da presença de substratos na água como folhas e galhos em decomposição. O gênero *Phylloicus* ocorreu em apenas dois igarapés (Ferroada, Lajeado), no total seis insetos, possivelmente por esses dois ambientes aquáticos se encontrarem menos impactados e com dificuldade de acesso.

No período chuvoso também influencia na redução da quantidade desses insetos, possivelmente pelo aumento da velocidade da água e carregamento de detritos vegetais. Indivíduos dípteros podem ser encontrados em ecossistemas

impactados, utilizando folhas, galhos, frutos e sementes fornecidos pela vegetação da margem do ambiente aquático como alimentação (ARIMORO; IKOMI; IWUEGBUE, 2007; OLIVEIRA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2009).

4.3 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

As leveduras foram encontradas apenas no trato digestório dos insetos coletados em cinco dos igarapés: Afluente do Silêncio (R4), Ferroada (R7), Do meio (R8), Catitu (R9) e Lajeado (R10). No total foram isoladas 22 leveduras diferentes de oito insetos fragmentadores. Todos os isolados receberam um código de acordo com o protocolo da Rede Bionorte, que segue uma numeração em ordem crescente em cada ponto de coleta, como descrito na Tabela 3.

As leveduras isoladas dos insetos coletados nos igarapés dos pontos: R4 (um inseto), R8 (dois insetos) e R9 (dois insetos) foram isoladas de fragmentadores do gênero *Stenochironomus*, encontrados em folhas em decomposição submersas nas águas limpas com leve correnteza nos igarapés Afluente do Silêncio e Do Meio, e em águas paradas e turvas no igarapé Catitu. Já nos pontos R7 (dois insetos) e R10 (um inseto) foram isoladas leveduras de insetos do gênero *Phylloicus*, encontrados sobre pedras submersas em águas limpas com correnteza fraca.

A maior ocorrência de leveduras foi encontrada em insetos fragmentadores do gênero *Stenochironomus*, 15 leveduras. Pode-se relacionar esses resultados com a variedade de substratos, folhas, a eles disponíveis no ambiente aquático (Tabela 3). Em insetos do gênero *Phylloicus* foram encontradas a menor ocorrência de leveduras, apenas sete. Esse baixo número está relacionado com os poucos espécimes de fragmentadores do gênero encontrados em apenas três dos dez igarapés.

Tabela 3 – Contagem e frequência dos isolados de insetos fragmentadores coletados em igarapés na Serra do Tepequém-RR

Pontos	Igarapé	Insetos fragmentadores	Leveduras	Contagem (UFC/300µL)	Frequência (UFC/mL)
R1	Da Anta	-	-	-	-
*R2	Miudinho	-	-	-	-
R3	Promessa	-	-	-	-
R4	Afluente do Silêncio	<i>Stenochironomus</i>	R4L1	01	03
R5	Silêncio	-	-	-	-
R6	Geladeira	-	-	-	-
R7	Ferroada	<i>Phylloicus</i>	R7L2, R7L3, R7L4, R7L5	04	13
R8	Do meio	<i>Stenochironomus</i>	R8L1, R8L2, R8L3, R8L4, R8L5	05	17
R9	Catitu	<i>Stenochironomus</i>	R9L1, R9L2, R9L3, R9L4, R9L5, R9L6, R9L7, R9L8, R9L9 R10L4, R10L5, R10L7	09	30
R10	Lajeado	<i>Phylloicus</i>	R10L4, R10L5, R10L7	03	10
Total				22	73

Legenda: * = No igarapé do ponto R2 não houve coleta de insetos fragmentadores.

Às interações entre leveduras e animais, são bastante variáveis, podendo ser harmônicas ou não. Entre leveduras e insetos, por haver uma alta diversidade de organismos envolvidos nessa interação, há a possibilidade de descoberta de novas espécies com potencial biotecnológico, sobretudo quando essas interações ocorrem entre leveduras e insetos terrestres (GANTER, 2006; SUH et al., 2005).

Dos isolados obtidos neste trabalho, 20 leveduras apresentaram um tempo de crescimento considerado rápido, até cinco dias. Duas cepas apresentaram um período de crescimento maior, até dez dias. Diferindo dos resultados obtidos por Matos et al. (2014), que observou que leveduras isoladas de cupins (*Nasutitermes sp.*) coletados na Floresta Amazônica apresentaram crescimento celular lento, de até 15 dias.

4.4 PERFIL FERMENTATIVO DAS LEVEDURAS

As 22 leveduras previamente selecionadas a partir dos procedimentos descritos no item 3.3.6, foram testadas quanto a sua capacidade de fermentação, utilizando meio basal para fermentação (MBF) com cinco tipos de açúcares, Glicose, Xilose,

Maltose, Melibiose e Galactose, a 25°C em BOD, formando assim um perfil fermentativo (Tabela 4).

No teste de fermentação com Glicose, seis isolados apresentaram fermentação forte: R7L3, R8L3, R8L4, R8L5, R10L4, R10L7 (30%); 15 leveduras fermentaram: R4L1, R7L2, R7L4, R7L5, R8L1, R8L2, R9L1, R9L2, R9L3, R9L4, R9L5, R9L7, R9L8, R9L9, R10L5 (68%); apenas a levedura R9L6 não apresentou capacidade de fermentar em MBF com glicose (2%).

Na fermentação com Galactose, quatro das cepas tiveram fermentação forte: R7L4, R10L4, R10L5, R10L5 (20%); seis dos isolados fermentaram: R4L1, R8L1, R8L2, R8L4, R9L7, R9L9 (30%); e 12 isolados não fermentaram: R7L2, R7L3, R7L5, R8L3, R8L5, R9L1, R9L2, R9L3, R9L4, R9L5, R9L6, R9L8 (50%). No teste com Maltose sete leveduras fermentaram: R8L3, R9L1, R9L2, R9L4, R9L5, R10L4, R10L5 (30%); e 15 cepas não fermentaram (70%). O teste de fermentação com Melibiose apresentou os seguintes resultados: dois isolados obtiveram fermentação forte (9%); seis fermentaram (27%); e 14 não fermentaram (64%).

Em relação ao teste com xilose, nenhum dos isolados foi capaz de fermentar. Apesar das leveduras não apresentarem capacidade de fermentar xilose, 21 cepas assimilaram D-xilose (94,6%) e apenas uma estirpe não assimilou. No trabalho de Matos et al. (2014), foram isoladas 54 leveduras do abdômen de cupins coletados na Floresta Amazônica, onde 12 cepas apresentaram potencial para assimilar D-xilose e apenas uma com potencial para fermentar. Existem relatos na literatura científica, como os de Lynd, Wyman, Gerngross (1999), onde cepas selvagens de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* não assimilam xilose, porém são amplamente aplicadas na indústria de alimentos e bebidas, devido ao seu potencial em fermentar vários outras hexoses para produção de combustíveis, energia e alimentação, substituição de produtos químicos derivado de recursos fósseis por um produto derivado de biomassa, com características funcionais paralelas, porém com uma composição diferenciada.

Dentre as leveduras isoladas duas fermentaram quatro dos cinco açúcares testados (R10L4 e R10L5). Quatro leveduras fermentaram três açúcares (R7L4, R9L1, R9L4, R10L7) e outras quatro fermentaram apenas um açúcar (R7L3, R7L5, R9L3, R9L8). Mais da metade dos isolados fermentaram dois açúcares (R4L1, R7L2, R8L1, R8L2, R8L3, R8L4, R8L5, R9L2, R9L5, R9L7, R9L9). O processo de conversão da biomassa lignocelulósica a bioetanol eficiente e economicamente viável depende

principalmente da fermentação de monoméricos de açúcares provenientes da hemicelulose, juntamente com a glicose derivada da celulose. Por esta razão, várias pesquisas têm buscado por microrganismo nativo (ou selvagem) capaz de fermentar eficientemente a glicose e a xilose em etanol. As cepas de *S cerevisiae* de tipo selvagem podem fermentar facilmente a glicose, bem como outros componentes de açúcar da biomassa, como manose, frutose e galactose (KURTZMAN et al., 2011).

Tabela 4 – Perfil fermentativo das leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém-RR.

Leveduras	Substratos				
	Glicose	Galactose	Xilose	Maltose	Melibiose
R4L1	+	+	-	-	-
R7L2	+	-	-	-	++
R7L3	++	-	-	-	-
R7L4	+	++	-	-	+
R7L5	+	-	-	-	-
R8L1	+	+	-	-	-
R8L2	+	+	-	-	-
R8L3	++	-	-	+	-
R8L4	++	+	-	-	-
R8L5	++	-	-	-	+
R9L1	+	-	-	+	+
R9L2	+	-	-	+	-
R9L3	+	-	-	-	-
R9L4	+	-	-	+	++
R9L5	+	-	-	+	-
R9L6	-	-	-	-	-
R9L7	+	+	-	-	-
R9L8	+	-	-	-	-
R9L9	+	+	-	-	-
R10L4	++	++	-	+	+
R10L5	+	++	-	+	+
R10L7	++	++	-	-	+

Legenda: (++) Fermentação Forte / (+) Fermentação / (-) Ausência de Fermentação

A cepa R9L6 não fermentou nenhum dos açúcares testados. Apesar de não apresentar perfil fermentativo. Há relatos na literatura científica de aplicações de leveduras não fermentativos em vários ramos da biotecnologia, podendo assim ser objeto de estudos futuros (KURTZMAN et al., 2011). Sendo uma levedura basidiomicéticas a estirpe R9L6 pode ser aplicada, por exemplo, na indústria de óleos microbianos e enzimas. As leveduras do gênero *Debanomyces spp.*, que também são

ascomicetos, em especial, *D. hansenii*, possui potencial biotecnológico em diversas áreas (BREUER; HARMS, 2006).

Alguns basidiomicetos pertencem também ao grupo de leveduras oleaginosas, algumas podem acumular de 20 a 70% de sua biomassa como lipídios (COHEN; RATLEDGE, 2005; RATLEDGE, 2002). Além das leveduras do gênero *Debianomyces*, outras compõem o grupo das oleaginosas como *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* (*Hansenula*), *Lipomyces*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Yarrowia* (FICKERS et al., 2005, PAPANIKOLAOU et al., 2002).

As leveduras do gênero *Yarrowia* são ascomicética e tem como importância industrial, a capacidade de produzir significantes níveis de enzimas lipolíticas com aplicações industriais. Avaliada também como uma fonte de proteína de célula única (SCP) a partir de substratos lipídicos, tais como óleos brutos e hidrocarbonetos (COHEN, RATLEDGE 2005, RATLEDGE 2002).

A fermentação de açúcares é uma característica de muitas espécies de *Saccharomycetales*. Em algumas espécies, a fermentação de glicose e outros açúcares, como a xilose é mais rigorosa que em espécies vizinhas. Como por exemplo, em estirpes de *Kuyveromyces aestuarii* que fermentam fortemente vários açúcares, enquanto que *K. nonfermentans* tem como característica a ausência de fermentação (KURTZMAN et al., 2011).

4.5 IDENTIFICAÇÃO CONVENCIONAL

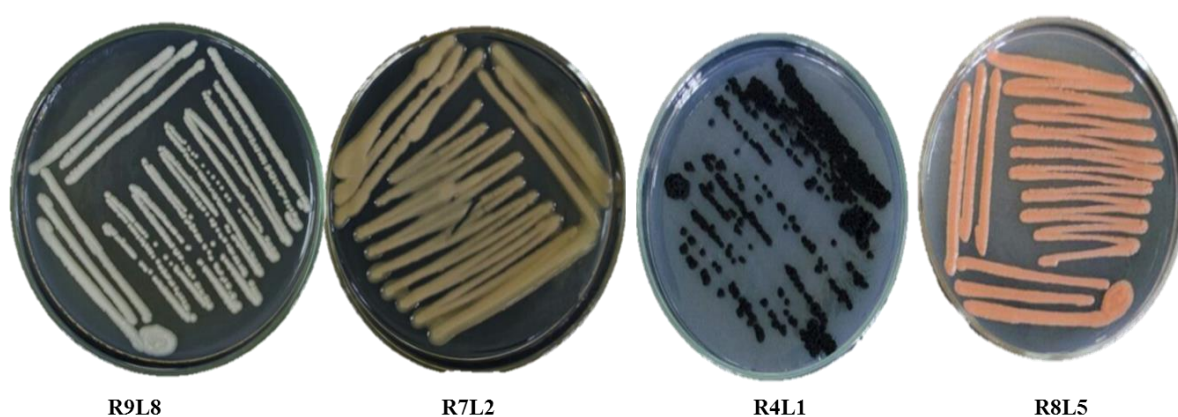
Para a identificação convencional dos isolados realizou-se um perfil das leveduras por meio de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, partindo das características morfológicas descritas na caracterização inicial.

4.5.1 Perfil morfológico das leveduras

Macromorfolologicamente, as cepas de leveduras apresentaram coloração que variaram entre preta, amarelo ouro, rosa pink, bege, branco gelo, creme e branco, sendo bege a cor predominante (Figura 9). De acordo com Yarrow (1998) as colônias

de leveduras apresentam predominantemente a coloração branca a bege. Ainda de acordo com o autor, outras cores como: vermelho, laranja, entre outras cores mais fortes, deve-se à produção de pigmentos carotenoides e são características de gêneros de leveduras, como por exemplo, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* e *Sporidiobolus*. Algumas leveduras encontradas em folhas produzem pigmentos carotenoides, provavelmente para proteção contra luz direta (ATLAS; BARTHA, 1997).

Figura 9 – Variação de cor nos aspectos morfológicos de leveduras isoladas de fragmentadores dos gêneros *Stenochironomus* e *Phylloicus* coletados da Serra do Tepequém-RR



Dentre os fungos semelhantes a leveduras, os mais comuns encontrados em folhas, são os fungos *Aureobasidium pulullans*, que pertencem ao grupo das leveduras pretas. Esses adquirem a cor preta com o passar do tempo em laboratórios, provavelmente devido à formação de células resistentes com parede celular espessa (clamidósporos melanizados) segundo De Hoog e Yurlova (1994). De acordo com Gunde-Cimerman et al. (2000), algumas leveduras pretas pertencem aos gêneros *Hortaeaewerneckii*, *Phaeothecatriangularis*, *Trimmatostromasalinum* e *Aureobasidium*.

Todas as leveduras isoladas do trato digestório de insetos fragmentadores, coletados em igarapés na Serra do Tepequém-RR foram contabilizadas e caracterizadas macromorfológicamente, resultando em 22 isolados, as quais receberam códigos em ordem crescente referente a cada igarapé antecedido da letra R, inicial do nome do estado de Roraima. A levedura R4L1 apresentou características distintas de todas as demais, textura seca membranosa, cor preta, ao tocá-la com alça de platina observou-se que na base há outra textura cremosa da mesma cor.

A textura das leveduras variou entre cremosa e membranosa; a cor do reverso e verso variaram entre bege, branco gelo e creme; a borda entre regular e irregular; a superfície entre lisa e ondulada; e o aspecto variou entre brilhante, úmido e opaco (Tabela 5). O isolado R7L2 se destaca por apresentar a cor amarelo ouro, única entre eles. Em destaque também, a cepa R8L5 por possuir a cor rosa pink, superfície lisa e aspecto brilhante (Figura 9).

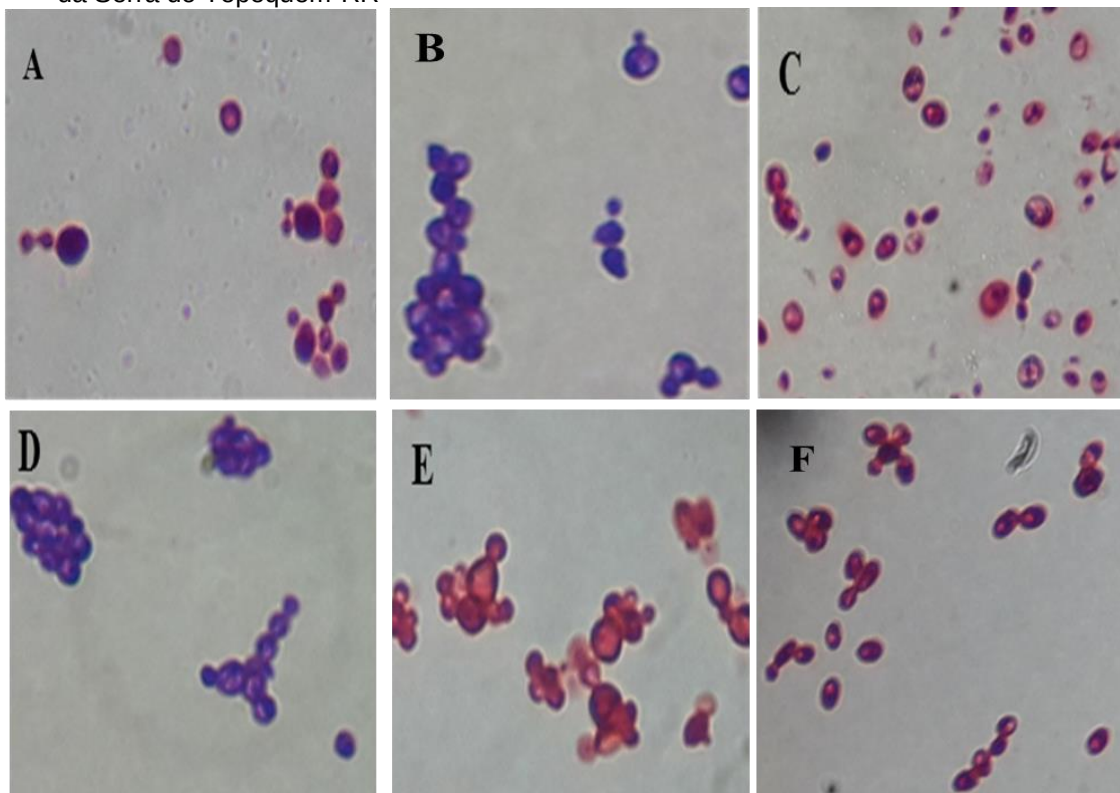
Tabela 5 – Características macromorfológicas das leveduras isoladas de fragmentadores da Serra do Tepequém-RR

CÓDIGO	DESCRIÇÃO
R4L1	Textura seca membranosa, reverso e verso preto, borda irregular, superfície ondulada, aspecto opaco
R7L2	Textura membranosa, reverso e verso cor amarelo ouro, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante
R7L3	Textura cremosa, reverso e verso cor branco gelo, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R7L4	Textura "membranosa", reverso e verso cor branco gelo, borda irregular, superfície ondulada, aspecto opaco
R7L5	Textura cremosa, reverso e verso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante
R8L1	Textura cremosa, reverso e verso cor creme, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante
R8L2	Textura cremosa, reverso e verso cor bege, superfície lisa, borda regular, aspecto úmido
R8L3	Textura cremosa, reverso e verso cor bege, superfície lisa, borda irregular, aspecto opaco
R8L4	Textura cremosa, reverso e verso cor creme, borda irregular, superfície lisa, aspecto brilhante
R8L5	Textura cremosa, reverso e verso rosa pink, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante
R9L1	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L2	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L3	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante
R9L4	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L5	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L6	Textura cremosa, reverso cor creme, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L7	Textura cremosa, reverso cor bege, borda irregular, superfície lisa, aspecto opaco
R9L8	Textura cremosa, reverso cor branco gelo, borda regular, superfície lisa, aspecto úmido
R9L9	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto úmido
R10L4	Textura cremosa, reverso cor branco gelo, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R10L5	Textura cremosa, reverso cor branco gelo, borda regular, superfície lisa, aspecto opaco
R10L7	Textura cremosa, reverso cor bege, borda regular, superfície lisa, aspecto brilhante

Os 22 isolados caracterizados macroscopicamente foram também observados microscopicamente, onde foi possível verificar o formato das células que variaram entre ovais e alongados. A maioria dos isolados forma um conjunto de células em cadeias. Na maioria dos isolados observou-se a reprodução de brotamento

multilateral, onde as células brotam de mais de um lado, também foi observado um brotamento em cadeia (Figura 10), esses aspectos observados são semelhantes a leveduras ou estruturas filamentosas associadas à *Candida* spp. (GUARNER; BRANDT, 2011).

Figura 10 – Aspectos microscópios de leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém-RR



Legenda: A= R10L4, B= R9L3, C= R9L9, D= R8L5, E= R8L2, F= R10L5.

4.5.2 Perfil fisiológico e bioquímico de leveduras

Os resultados dos testes fisiológicos e bioquímicos realizados para identificação dos isolados estão no Apêndice A. Nos testes de crescimento em diferentes temperaturas, todos os isolados cresceram a 37°C. Segundo Edgardo et al. (2008), a temperatura ideal para o processo de sacarificação e fermentação simultânea está entre 45°C e 50°C; enquanto que a temperatura ótima para a fermentação seria entre 25°C e 35°C. Leveduras termotolerantes, com crescimento acima de 35°C são importantes para a indústria que trabalha com elevadas temperaturas e altas concentrações de etanol.

Estirpes do gênero *S. cerevisiae* submetidas a stress de altas temperaturas, tem sua eficiência reduzida no processo de fermentação, devido ao aumento da fluidez nas membranas. Para uma conversão eficiente de biomassa lignocelulósica em etanol, outra característica desejável do microrganismo é a capacidade de fermentar outros açúcares. Nesta pesquisa, todos os isolados cresceram a 37°C sendo, portanto promissoras para aplicações biotecnológicas.

Nos testes de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio, todos os isolados assimilaram nitrato, 17 dos isolados (77%) assimilaram Nitrito: R7L4, R8L1, R8L2, R8L3, R8L4, R8L5, R9L1, R9L3, R9L4, R9L5, R9L6, R9L7, R9L8, R9L9, R10L4, R10L5 e R10L7. Dentre os isolados 21 (95,4%) assimilaram Lisina, com exceção do isolados: R4L1.

Os isolados R4L1, R7L2, R7L3, R7L5 e R9L2 assimilaram apenas nitrato como fonte de nitrogênio. A assimilação de nitrato como única fonte de nitrogênio foi anteriormente considerado um critério para a circunscrição dos gêneros: reação negativa para *Pichia*, e positiva para *Hansenula*. De acordo com Kurtzman et al. (2011), a assimilação de nitrato é uma característica variável de identificação de leveduras. Embora em árvores filogenéticas dos gêneros *Barnettozyma*, *Lindnera*, *Ogataea* e *Wickerhamomyces* mostram que espécies que assimilam nitrato estão intimamente relacionadas com aqueles que não assimilaram.

Do total de isolados 14 (63,63%) cresceram no meio com 50% de glicose: R7L3, R8L3, R8L4, R8L5, R9L3, R9L4, R9L5, R9L6, R9L7, R9L8, R9L9, R10L4, R10L5 e R10L7. Quatro isolados foram resistentes a cicloheximida: R4L1, R9L3, R9L8 e R9L9 (18%); e seis isolados resistentes a NaCl 10%: R8L4, R8L5, R9L7, R10L4, R10L5, R10L7 (30%). Todos os isolados cresceram em meio com carbonato; e todos cresceram na ausência de aminoácidos (Figura 11).

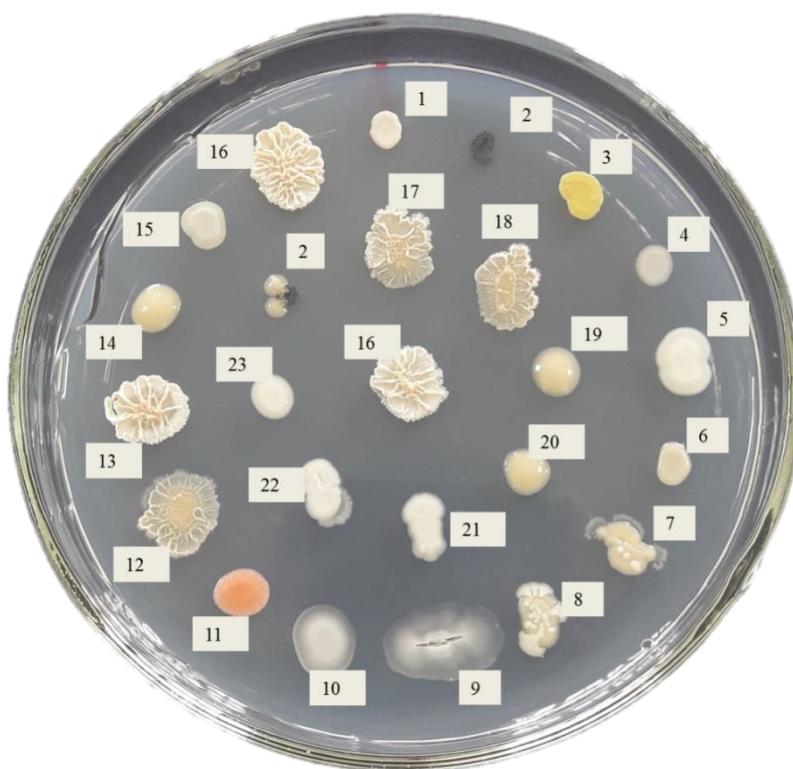
Das fontes de carbono, 100% dos isolados assimilaram diferentes fontes de carbono, assim possuem perfil promissor de assimilação. A levedura R7L2 foi a única que não assimilou D-xilose, essa estirpe apresentou perfil de crescimento e assimilação de fontes de nutrientes distintas dos demais isolados. Apenas ácido acético, não foi assimilado por nenhum dos isolados.

Todas as leveduras assimilaram Hexadecano como fonte de carbono. Esta característica corresponde razoavelmente a identificação convencional, embora englobe uma ampla filogenia. Estirpes de leveduras que utilizam hexadecano produzem ubiquinonas (molécula orgânica, geralmente contendo fósforo e algumas

vitaminas) e coenzimas Q-8 e Q-9, embora nem todas as espécies tenham o potencial para produzir essas coenzimas, qualquer um desses ubiquinones assimilará hexadecano, como por exemplo *Trichomonascus*, *Blastobotrys*, *Raffinosifermentans* (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

A observação de crescimento, assimilação e reação a fontes de nutrientes, são testes comumente usados para identificação de leveduras, servem como preditores de relações filogenéticas entre espécies. Esses testes que têm valor preditivo refletem vias únicas, a partir desta observação, as espécies descobertas para ter propriedades metabólicas atípicas parecem para ocorrer apenas em certos clados (KURTZMAN et al., 2011).

Figura 11 – Leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores da Serra do Tepequém - RR, inoculadas em meio de cultura sem aminoácidos



Legenda: 1- Cepa de *Saccharomyces* (Controle Positivo); 2- R4L1; 3- R7L2; 4- R7L3; 5- R7L4; 6- R7L5; 7- R8L1; 8- R8L2; 9- R8L3; 10- R8L4; 11- R8L5; 12- R9L1; 13- R9L2; 14- R9L3; 15- R9L4; 16- R9L5; 17- R9L6; 18- R9L7; 19- R9L8; 20- R9L9; 21- R10L4; 22- R10L5; 23- R10L7.

Os isolados nesta pesquisa submetidos ao teste de reação ao corante DBB apresentam 11 cepas com características basidiomicéticas: R4L1, R7L2, R7L3, R7L5, R8L3, R8L4, R8L5, R9L1, R9L5, R9L6, R9L7, e 11 com cepas perfil ascomicéticas: R7L4, R8L1, R8L2, R9L2, R9L3, R9L4, R9L8, R9L9, R10L4, R10L5 e R10L7, como

descritos na tabela 6. As colônias de leveduras basidiomicetos reagem com diazônio azul B formando a cor avermelhada, quanto não há reação de cor das colônias, infere-se que são leveduras ascomicetos. Leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados nesta pesquisa apresentaram divisão equitativa entre as dois filos, Basidiomicetos e Ascomicetos.

Tabela 6 – Classes das leveduras isoladas de fragmentadores da Serra do Tepequém-RR, e divididas entre os grupos basidiomicetos e ascomicetos pela reação ao corante DBB

Leveduras	Classe
R4L1	Basidiomicetos
R7L2	Basidiomicetos
R7L3	Basidiomicetos
R7L4	Ascomicetos
R7L5	Basidiomicetos
R8L1	Ascomicetos
R8L2	Ascomicetos
R8L3	Basidiomicetos
R8L4	Basidiomicetos
R8L5	Basidiomicetos
R9L1	Basidiomicetos
R9L2	Ascomicetos
R9L3	Ascomicetos
R9L4	Ascomicetos
R9L5	Basidiomicetos
R9L6	Basidiomicetos
R9L7	Basidiomicetos
R9L8	Ascomicetos
R9L9	Ascomicetos
R10L4	Ascomicetos
R10L5	Ascomicetos
R10L7	Ascomicetos

Nesta pesquisa as estirpes isoladas apresentaram reação lenta ao corante DBB, mais de 2 minutos. Resultado semelhante ao trabalho realizado por Van der Walt e Hopsu-Havu (1976), as estirpes *Sporopachydermia quercuum* e *S. lactativora*, apresentaram reação mais lenta que o comum para as demais estirpes testadas. Porém para *S. cereana* a reação ocorre normalmente. Apesar das poucas exceções, o teste DBB foi extremamente útil para reconhecer o phylo de leveduras anamórficas

Um total de 22 colônias de leveduras foram isoladas de insetos fragmentadores dos gêneros *Stenochironomus* e *Phylloicus*. Delas foram inicialmente extraídas o DNA, seguido da amplificação e sequenciamento. Baseado na análise das sequências, as leveduras foram identificadas como exemplares de oito espécies distintas, distribuídas em sete gêneros.

4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Na identificação molecular dos isolados realizou-se a extração do DNA, amplificação e sequenciamento, as sequências foram analisadas para identificação a nível de gênero e espécie.

4.6.1 Extração de DNA

As leveduras R7L3, R7L4, R7L5, R7L9, R10L4, R10L5, R8L1, R8L2, R8L3, R8L4, R9L5, R4L1, R9L9, R8L5, R9L4, R9L8 e R9L4 apresentaram bandas fortes, indicando uma quantidade de DNA satisfatória para seguir as próximas etapas de identificação molecular (Apêndice C). As leveduras R9L1 e R9L2 apresentaram bandas fracas (Figura 12), sugerindo baixa quantidade de DNA ou falha no processo de extração, que posteriormente foi solucionado em outras extrações.

Com o DNA das leveduras extraídas, seguiu-se para amplificação com os iniciadores NL1 e NL4, onde todas as amostras amplificaram (Figura 13). O tamanho dos fragmentos variou entre 400 pares de bases (pb) o menor e 780 pb o maior. Possivelmente, devido ao tamanho das sequências D1/D2, não foi possível utilizá-la nas identificações das leveduras.

Figura 12 - Amostras de DNA de leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém /RR, com protocolo de De Hoog et al 2005. Marcador Lâmbda (100ng/ μ L), gel de agarose 0,8%.

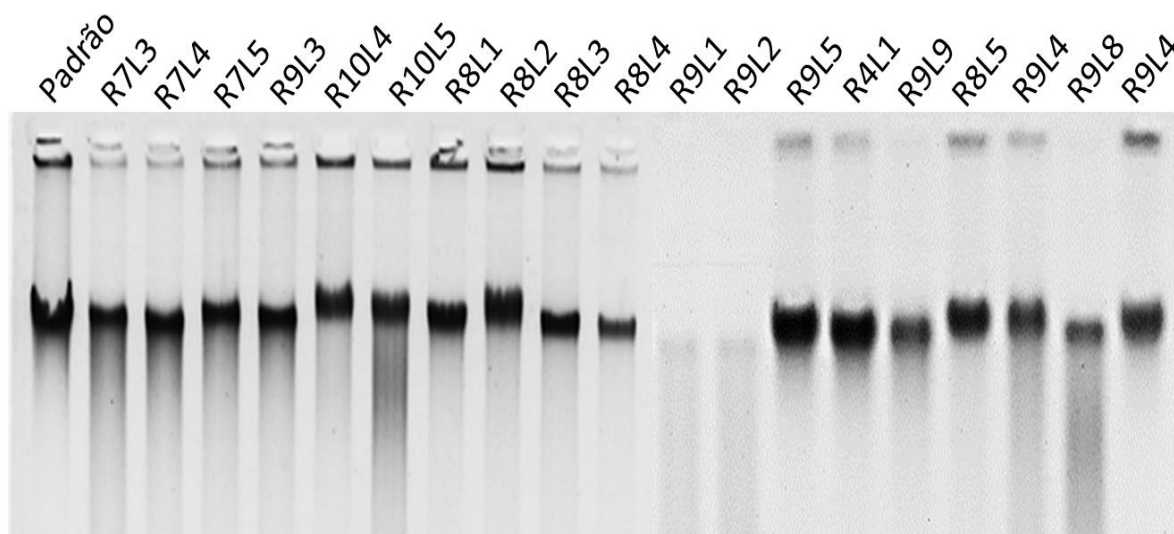
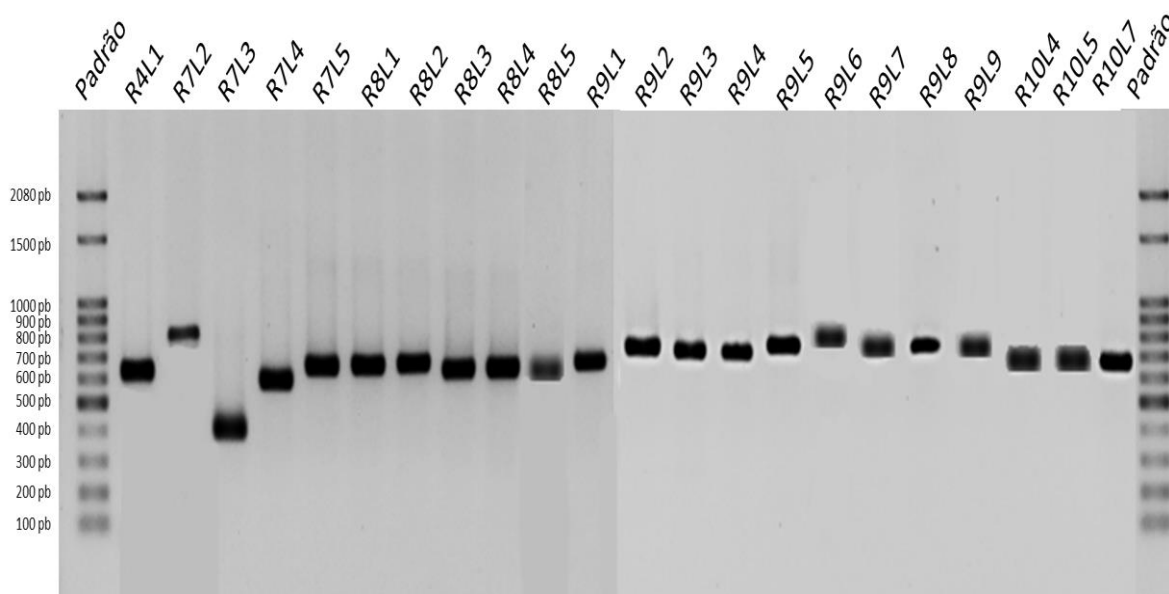
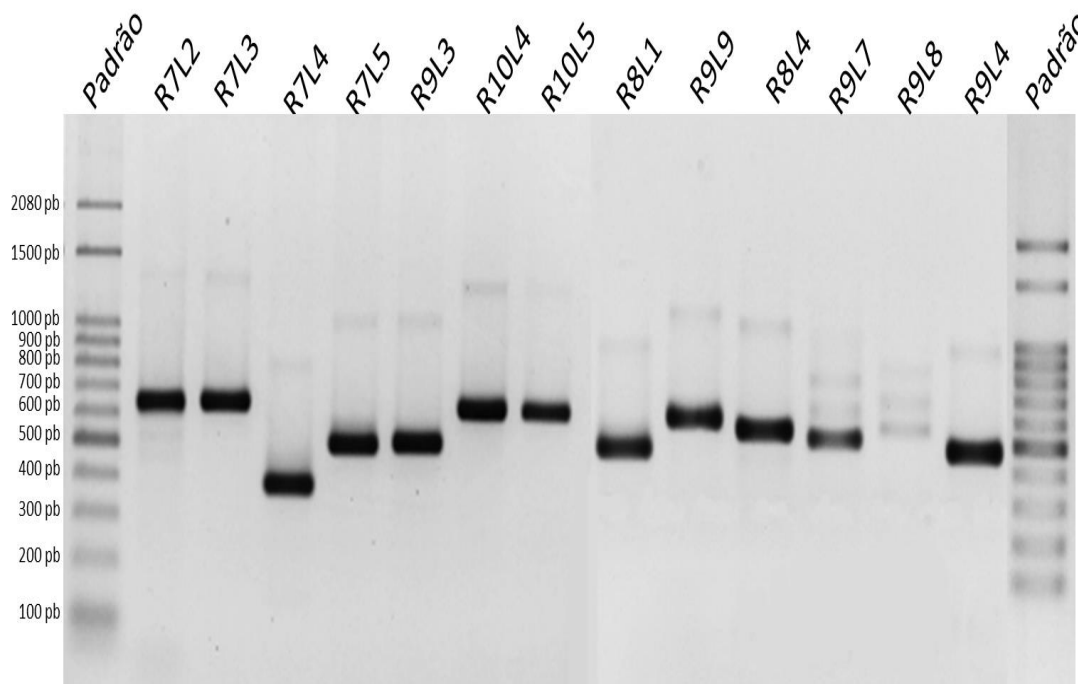


Figura 13 - Perfil de amplificação de leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém /RR, utilizando iniciador NL1/NL4, padrão *Ladder* (100 pb), gel de agarose 1,2%.



Realizou-se também a amplificação do DNA dos isolados com os iniciadores ITS1 e ITS4. A maioria das amostras amplificaram, duas apresentaram bandas inespecíficas, R9L7 e R9L8, esta última amostra não apresentou banda definida nesta amplificação, mas posteriormente obteve-se uma banda definida. O tamanho dos fragmentos variou entre 360 pb a 680 pb (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de amplificação de leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém /RR, utilizando iniciador ITS1/ITS4, padrão *Ladder* (100 pb), gel de agarose 1,2%.



Os resultados das duas amplificações, com os dois pares de iniciadores, foram considerados promissores para realização do sequenciamento e posterior análise das sequências.

4.6.2 Análise das sequências de leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém - RR

As análises das sequências das leveduras apresentaram como resultado similaridades variando entre 94% a 100%, com cinco gêneros já identificadas no GenBank (Tabela 7).

O tamanho dos fragmentos dos isolados amplificados com iniciadores ITS1 e ITS4 variou entre 380 pb e 525 pb, e as sequências obtiveram tamanho entre 525 pb a 364 pb (Tabela 7). A partir da análise das sequências, foram construídas três árvores filogenéticas com as melhores sequências obtida com os iniciadores ITS.

Tabela 7 - Leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém/RR, tamanho do fragmento, tamanho da sequência (ITS1/ITS4), similaridade e acesso ao GenBank

LEVEDURAS	INSETOS	FRAGMENTO	Tamanho da sequência ITS1/ITS4	% SIMILARIDADE	GENBANK
R4L1	<i>Stenochironomus</i>	600 pb			
R7L2	<i>Phylloicus</i>	680 pb			
R7L3	<i>Phylloicus</i>	680 pb	525 pb	99% <i>Yamadazyma akitaensis</i>	NR 138229.1
R7L4	<i>Phylloicus</i>	380 pb			
R7L5	<i>Phylloicus</i>	500 pb	501 pb	*90% <i>Uncultured fungus</i>	KF274422.1
R8L1	<i>Stenochironomus</i>	500 pb	472 pb	94% <i>Cryptococcus cumiculi</i>	NR137887.1
R8L2	<i>Stenochironomus</i>	600 pb			
R8L3	<i>Stenochironomus</i>	600 pb	364 pb	98% <i>Aureobasidium pulluans</i>	LC 277151.1
R8L4	<i>Stenochironomus</i>	560 pb			
R8L5	<i>Stenochironomus</i>	600 pb			
R9L3	<i>Stenochironomus</i>	500 pb	419 pb	99% <i>Tremella globispora</i>	KY108572.1
R9L5	<i>Stenochironomus</i>	700 pb			
R9L7	<i>Stenochironomus</i>	500 pb			
R9L9	<i>Stenochironomus</i>	580 pb			
R10L4	<i>Phylloicus</i>	600 pb	502 pb	98% <i>Yamadazyma akitaensis</i>	NR 1382226

*Gênero de fungo não cultivável, esse resultado foi desconsiderado.

4.6.3 Análise filogenética de leveduras isoladas de insetos fragmentadores coletados na Serra do Tepequém - RR

A análise filogenética indicou que os isolados constituem três clados: *Aureobasidium* com três espécimes, *Yamadazyma* com cinco espécimes e *Tremella* com três espécimes.

Com base nos resultados obtidos no sequenciamento foram construídas três árvores filogenéticas. A árvore do clado *Aureobasidium*, foi construída utilizando cepas de leveduras isoladas de insetos fragmentadores isolados nesta pesquisa, R8L3, R8L4, R9L7 (Figura 15) e representantes de espécies já descritas, seguidas do número de acesso ao GenBank, para análise da similaridade entre elas.

Na árvore do clado *Yamadazyma* foram incluídos os isolados R7L3 (com repetição J9.2.17.1.17), R9L9 (7.21.01), e R10L4 e representantes de outros gêneros similares a *Yamadazyma*, como *Candida*, *Debaromyces* e *Babjeviella*, para verificar a semelhança entre eles (Figura 16). Os três isolados ficaram inseridos no clado *Yamadazyma*. A confiabilidade do resultado pode ser observada no número dos pontos (nós) de cada braço da árvore filogenética que variou entre 0,76 a 0,97.

O gênero *Yamadazyma* foi descrito por Billon-Grand (1989) para incluir espécies descritas no gênero *Pichia*. Estudos taxonômicos baseados em filogenética indicam o reposicionamento de diversos grupos, por isso faz necessário expandir a análise dos referidos isolados, incluindo a verificação de sequências de outros genes conservados, além de caracteres morfológicos, a fim de constatar a classificação taxonômica destes isolados em nível de espécie.

A árvore do clado *Tremella* foi reconstruída incluindo cepa dos isolados, R8L1, R9L3 e R7L5 (Figura 17), devido a similaridade de cada representante deste grupo, de acordo com GenBank.

Figura 15 - Cladograma filogenético do gênero *Aureobasidium* com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.

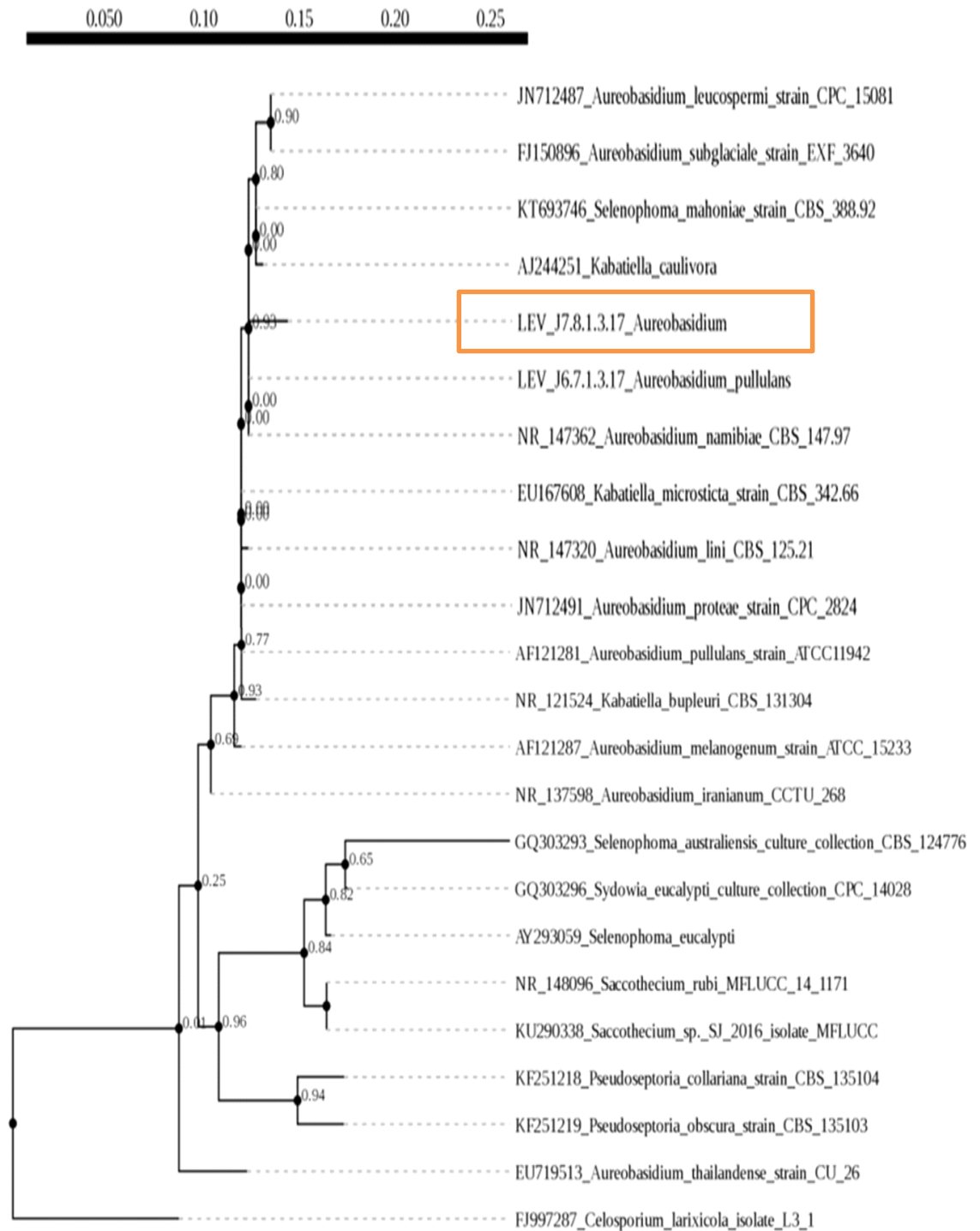


Figura 16- Cladograma filogenético do gênero *Yamadazyma* com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.

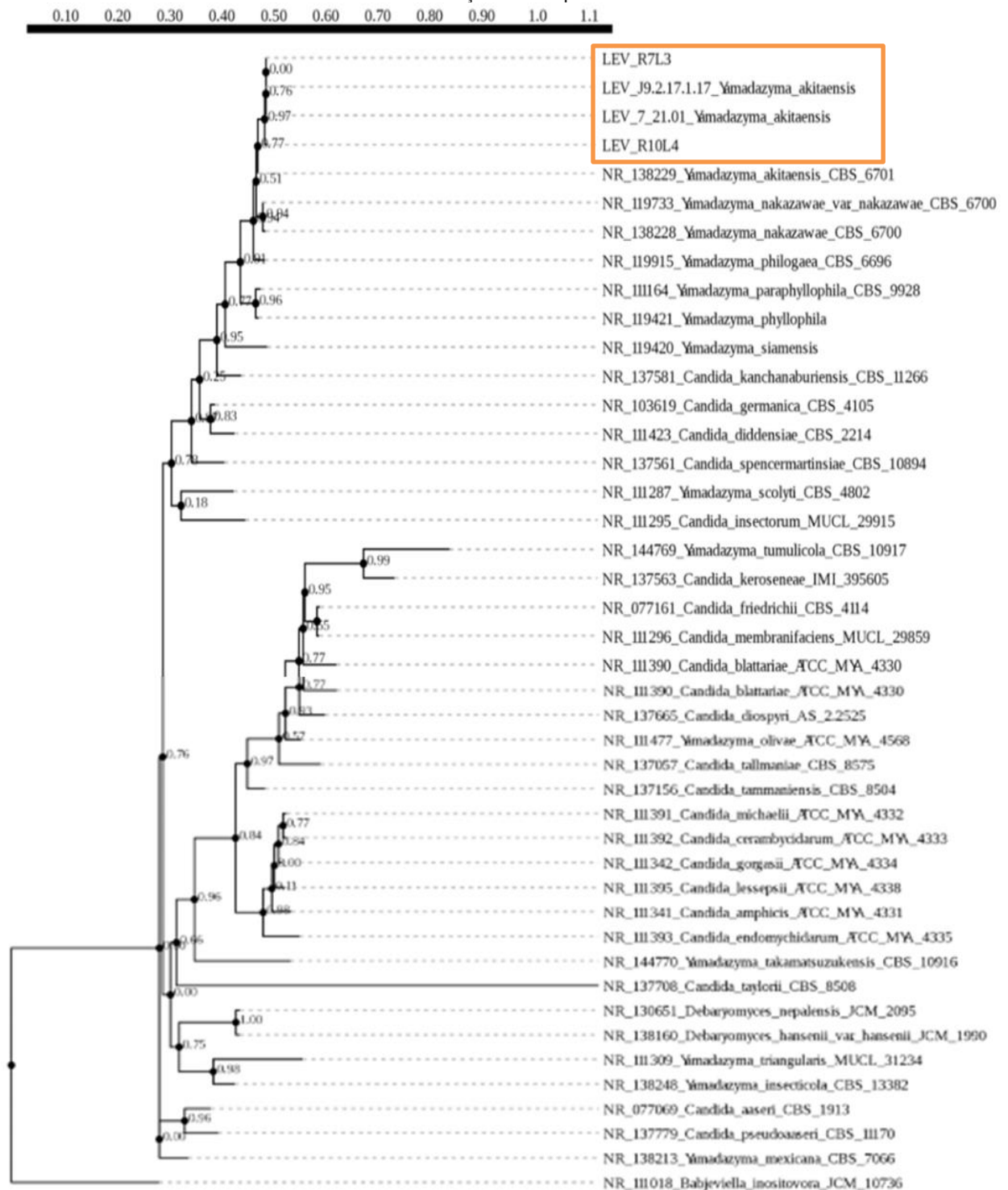
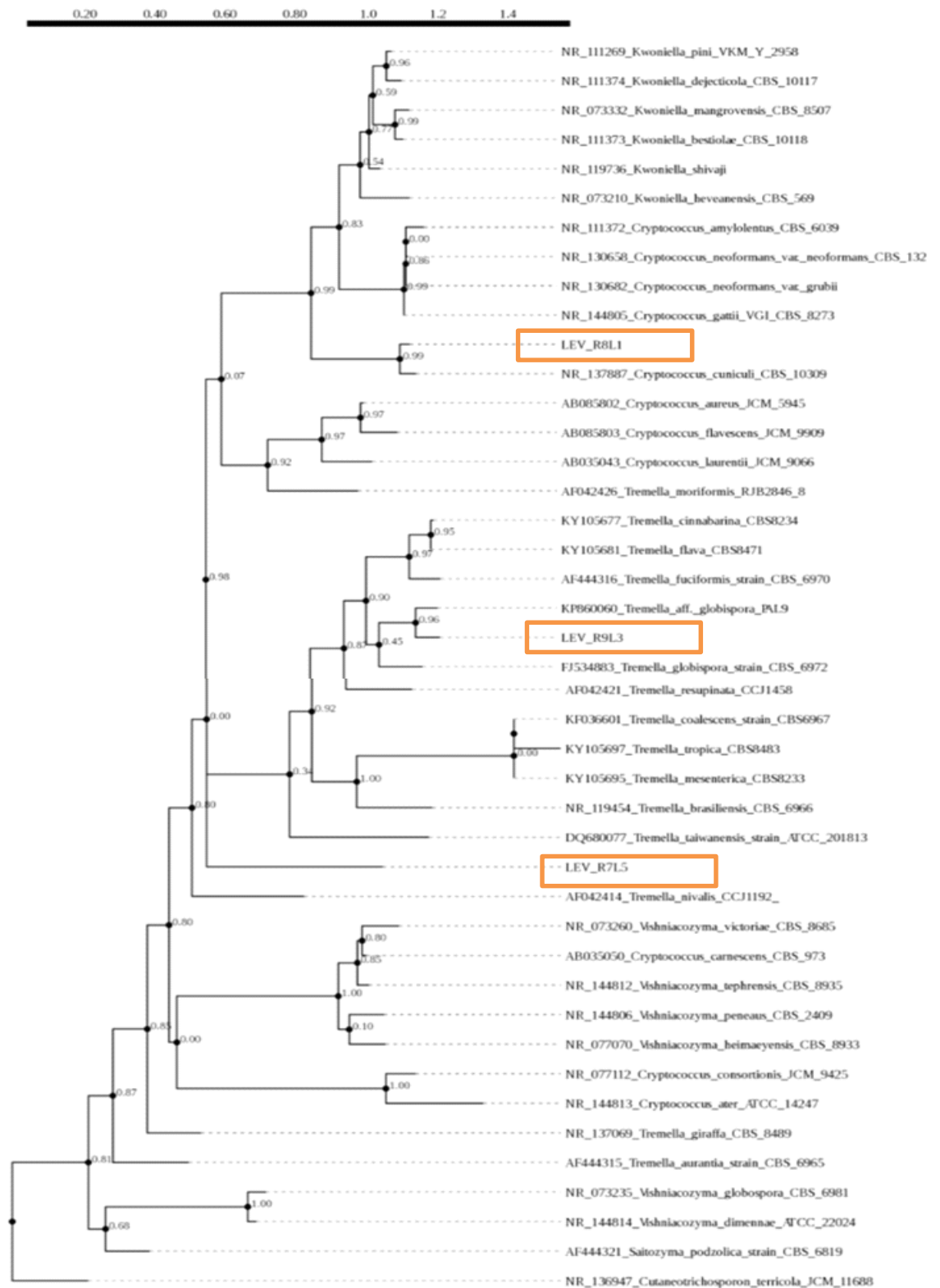


Figura 17- Cladograma filogenético do gênero *Tremella* com espécies identificadas baseada em uma análise de máxima verossimilhança das sequências ITS combinadas.



Dois isolados foram identificados como pertencentes ao clado *Aureobasidium*, R8L3 e R9L7, essa última identificada como *Aureobasidium pullulans* (Figura 15). O gênero *Aureobasidium* é um membro da ordem Dothideales (Ascomycota, Dothideomycetes), compreende 27 táxons de várias espécies. A espécie mais estudada é *A. pullulans*, principalmente em bancos de dados de pesquisa. As espécies descritas foram *A. leucospermi*, *A. proteae* e *A. thailandense*, sequenciando o rDNA com ITS para inferir a taxonomia e a filogenia de *Aureobasidium* nos clados já descritos (JOANNE; TAYLOR; CROUS, 2011).

Leveduras *Aureobasidium Pullulans* encontra-se amplamente distribuído em diferentes ambientes. Estirpes de *A. pullulans* podem produzir amilase, proteinase, lipase, celulase, proteína monocelular entre outros. Alguns genes dessa espécie que codificam proteinase, lipase, celulase, xilanase e sideróforo foram caracterizados e clonados. Considerada assim uma levedura biotecnológica importante que pode ser usada em diferentes campos (CHI et al. 2009). Deste modo, é muito importante pesquisar o DNA de levedura para encontrar novos bioprodutos e identificar novos genes destas leveduras.

Não foi encontrado na literatura científica consultada relato de leveduras associadas a insetos aquáticos fragmentadores. Muitas associações entre leveduras e coleópteros envolvem besouros que vivem sobre plantas (LACHANCE et al. 2003). Muitos besouros pequenos (nitidulídeos - ordem Coleoptera) se alimentam de seiva fermentada de plantas lenhosas e as leveduras representam uma parcela significativa da microflora que promove esta fermentação (NOUT; BARTELT 1998). As leveduras isoladas nesta pesquisa, R7L3, R9L9 e R10L4, identificadas como pertencentes ao gênero *Yamadazyma* pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 e região ITS estão inseridas no clado de *Yamadazyma* com variação *akitaensis* (Figura 16).

Com os resultados obtidos nesta pesquisa, as leveduras isoladas do trato digestório de insetos fragmentadores aquáticos foram identificadas pertencentes a quatro gêneros diferentes, são distintos dos encontrados por Wang et al. (2015), que coletaram e identificaram leveduras em amostras de madeira em decomposição como *Yamadazyma dushanensis* f.a., nov. sp., em áreas de floresta na China. As análises das sequências do gene D1/D2 e ITS revelaram que esta nova espécie está localizada no clado *Yamadazyma* (*Debaryomycetaceae* e *Saccharomycetales*), com três espécies estreitamente relacionadas, nomeada de *Yamadazyma terventina*, *Yamadazyma mexicana* e *Candida trypodendroni*.

Os isolados R8L1, R9L3 e R7L5, foram identificados como *Cryptococcus cumiculi*, *Tremella globispora*. Todas as três estirpes foram inseridas na árvore filogenética e integram o clado Tremella (Figura 17). De acordo com Ageitos et al., (2011), algumas espécies desses gêneros produzem polímeros que contêm proporções muito maiores de xilose do que os encontrados nos polímeros produzidos por *Cryptococcus laurentii*. Essas cepas que produzem polímeros que se assemelham aos polissacarídeos de *C. laurentii* também fornecem padrões semelhantes de assimilação de carbono, mas os tremolos que produzem polímeros com maior teor de xilose também assimilam menos compostos de carbono. Essas descobertas, juntamente com semelhanças na síntese e morfologia do amido, sugerem uma relação entre algumas espécies de *Tremella* e *Cryptococcus neoformans*.

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são geralmente descritas como causadoras de doenças em pacientes imunodeprimidos (HUFFNAGLE e NOVERR, 2013), embora algumas sejam reportadas com potencial biotecnológico na produção de biodiesel tendo em vista a capacidade de acumular óleos em sua biomassa, sendo referidas como leveduras oleaginosas (AGEITOS et al., 2011).

4.7 PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS LEVEDURAS FERMENTADORAS

A produção de etanol pelas leveduras fermentadoras com hidrolisado da casca de abacaxi apresentou rendimentos significantes em comparação com a literatura científica consultada (ALMEIDA et al. 2016; CHENG et al. 2007; COSTA et al. 2007).

4.7.1 Fermentação com hidrolisado da casca de abacaxi

A hidrólise (sem ácido) da casca de abacaxi resultou em 493,33 mL de volume final recuperado de hidrolisado hemicelulósico, viscoso, de cor marrom, com pH 4,5 (sem correção de pH) e açúcar redutor total na concentração de 149,7 g/L. Resultado próximo ao encontrado por Costa et al. (2007), que analisaram a farinha da casca de abacaxi e encontraram o valor de pH de 3,98 e açúcar redutor de 37,33 g/L de ARTs. Enquanto que o trabalho de Cheng et al. (2007), utilizando hidrólise ácida com bagaço

de cana de açúcar, obtiveram pH final 10,2; necessitando de neutralização para proporcionar o crescimento das leveduras.

Considerando que o processo de hidrólise executado neste trabalho não dispôs de outros pré-tratamentos, o hidrolisado tem grande potencial para a utilização no processo de fermentação por cepas de leveduras, considerado ser um resíduo agroindustrial abundante e barato. Por ser uma matéria-prima atrativa para uso em sacarificação e lucrativa, devido ao alto rendimento de glicose e baixo custo, sua utilização viabilizaria economicamente a produção de etanol (ALMEIDA et al., 2016).

A maioria dos substratos agroindustriais utilizados nos processos de fermentação necessita de hidrólise ácida para liberação dos açúcares, o que gera muitos inibidores ao crescimento microbiano, como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos: fórmico, levulínico e acético. Nessas condições, o crescimento microbiano seria inviável, necessitando a utilização de diversas técnicas de detoxificação. Dentre estas temos centrifugação, filtração, adição de carvão ativado, biodetoxificação, eletrodialise e correção do pH por adição de hidróxido de cálcio, algumas dessas técnicas podem ainda provocar a redução na concentração de açúcar redutor entre 5 e 12% (CANILHA et al., 2009; HOU-RUI et al., 2009).

Nesta pesquisa o hidrolisado de casca de abacaxi (HCA) utilizado tem como vantagem a obtenção dos açúcares utilizados no processo fermentativo sem a necessidade do emprego de ácido durante a hidrólise. Essa característica do hidrolisado das cascas de abacaxi utilizadas no experimento pode baratear os produtos biotecnológicos de valor agregado baseados em hidrolisados hemicelulósicos, haja vista a redução nos investimentos necessários à detoxificação e o alto teor de açúcares obtidos por hidrólise física.

O HCA foi utilizado neste trabalho como única fonte de nitrogênio, com isso foram obtidos resultados significantes de produção de etanol por cepas selvagens. Segundo Bach et al. (2005), o nitrogênio é o componente essencial para o crescimento adequado de microrganismos, principalmente os fermentadores, consequentemente indispensável no processo de fermentação. As leveduras requerem fontes específicas de nutrientes para seu crescimento adequado e conversão de açúcares em produto de interesse. A composição média deve conter nutrientes nas concentrações adequadas que proporcione resultados de produtividade desejada (SILVA et al., 2012).

O rendimento de açúcar redutor total (R_{ART}), calculado ao fim da fermentação foi de 22,04% por peso seco de farinha da casca de abacaxi (material lignocelulósico). Esse valor está próximo ao rendimento de 35,5% de ART, obtido na hidrólise ácida do bagaço de cana, ressaltando que antes da hidrólise o resíduo foi submetido a tratamento térmico (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009). Ao final do tempo de fermentação, a biomassa produzida por cada levedura foi pesada e convertida em gramas por litro (Tabela 8).

A tabela 8 apresenta resultados que demonstram um aumento significativo da quantidade de células inicial, decorrente de um crescimento celular em hidrolisado livre de ácidos e sem correção de pH, onde a cepa que produziu maior quantidade de biomassa foi a R8L5, a menor quantidade foi produzida pela R10L5, com valores de 52,96 e 2,79 g/L, respectivamente.

A quantidade de açúcares totais consumidos variou entre 11,75 e 56,2%. A levedura R8L5 foi a que mais assimilou açúcar acompanhado pela R8L3 e R10L7. O rendimento de biomassa em relação a qualidade de açúcar consumido para essa produção, também aponta um potencial da cepa R8L5 importante para a indústria, considerando que resultados próximos foram obtidos por Wilkins et al. (2008), utilizando *Kluyveromyces marxianus* IMB4 (linhagem termotolerante) em pH 5,5 a 40 °C, com assimilação total de 51,6% de xilose.

Tabela 8 – Biomassa produzida durante o ensaio em fermentômetro e ART consumido pelas leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém-RR.

Leveduras	Biomassa (g/L)	ART consumido (g/L)	Rendimento de Biomassa por Substrato consumido (g/L)	Etanol g/L	Rendimento de Etanol por ART consumido (g/L)
R7L3	30,18	132,1	0,22	27,2	0,20
R8L3	55,31	65,564	0,81	44,19	0,67
R8L5	161,7	65,564	2,46	28,8	0,43
R10L4	39,62	132,1	0,29	43,7	0,33
R10L5	26,7	132,1	0,20	28,9	0,22
R10L7	39,9	65,564	0,60	53,4	0,81

O rendimento de etanol das leveduras isoladas variou entre 27,2 g/L (R7L3) menor rendimento e 53, 4 g/L (R10L7) maior rendimento. Nos últimos anos, uma grande quantidade de métodos promissores foi descritos na literatura científica para o uso eficiente de resíduos de abacaxi, incluindo a produção de resíduos fenólicos

antioxidantes, ácidos orgânicos, biogás, fibras e microbiana enzimas (ISITUA et al., 2014). Além disso, os esforços foram direcionados para o uso de resíduos de abacaxi como substrato alternativo para a produção de etanol (CHOONUT; SAEJONG; SANGKHARAK, 2014).

O consumo de ARTs pelos isolados nesta pesquisa variou entre 132,1 e 65,564 (Tabela 7) que corresponde a 88% e 95% respectivamente. Valor superior ao obtido por estirpes de *Pichia tannophilus* e *P. guilliermondii*, com consumo de 85% de açúcar quando cultivadas para fermentação de D-xilose em meio de cultura com produtos sintéticos (ZOU et al., 2010). Valores superiores também aos encontrados por Matos et al. (2014) com *M. guilliermondii* LC27 e Converti et al. (1999) em *Pachysolentannophilus*, quando cultivada em meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (SBHH) o consumo de açúcar chega a 78,6%.

O nitrogênio é essencial para o crescimento adequado de microorganismos, principalmente os fermentadores, conseqüentemente, é indispensável no processo de fermentação (BACH et al., 2005). As leveduras requerem fontes específicas de nutrientes para seu crescimento adequado e conversão de açúcares em produto de interesse. A composição média deve conter nutrientes nas concentrações adequadas que proporcione resultados de produtividade desejada (SILVA et al. 2012). Provavelmente, as leveduras que tiveram baixa produção de biomassa necessitam que o hidrolisado seja suplementado com nitrogênio orgânico ou inorgânico, antes do processo de fermentação para o seu crescimento adequado.

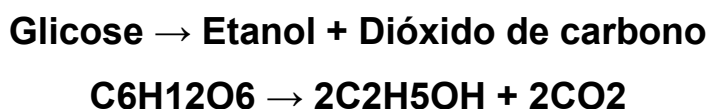
4.7.2 Rendimento da produção de etanol

Neste estudo a produção de etanol (evolução de CO₂), pelos isolados em HCA, apresentaram uma produtividade de etanol com valores interessantes para aplicação industrial (Figura 18). A maior atividade fermentativa foi observada na levedura R10L7, sendo que a maioria dos isolados atingiu o valor máximo após 48 horas de fermentação. Esses resultados corroboram aos citados na literatura científica, como os obtidos por Matos et al., (2014), onde o valor máximo ocorreu entre 36 e 60 horas. Resultados encontrados por Bhatt et al. (1987), apresentam uma elevada produção de álcool em menor tempo, até 35 horas de fermentação alcoólica utilizando *S. cerevisiae* como inóculo no mosto de mel diluído.

A concentração de açúcares durante a fermentação foi reduzida de um valor inicial de 149,7 g/L a 17,6 g/L, para as leveduras: R7L3, R10L4 e R10L5; para as cepas: R8L3, R8L5 e R10L7 a quantidade dos açúcares iniciais foram de 68,53 g/L e ao fim do processo restaram 2,96 g/L, em 90 horas de fermentação. Já a produção de etanol alcançou uma concentração final de: 27,2; 44,19; 28,90; 28,80; 43,66; 25,20 g/L pelas leveduras R7L3, R8L3, R8L5, R10L4, R10L5 e R10L7 respectivamente.

Na fermentação alcoólica de açúcares, a ação de leveduras, produz em proporções equimolares o etanol e o dióxido de carbono (Equação abaixo). Gay-Lussac foi pioneiro com esse mecanismo, onde 100 kg de glicose rendem 51,1 kg de etanol e 48,9 kg de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac e é o dado básico na eficiência de conversão (JACKMAN, 1991).

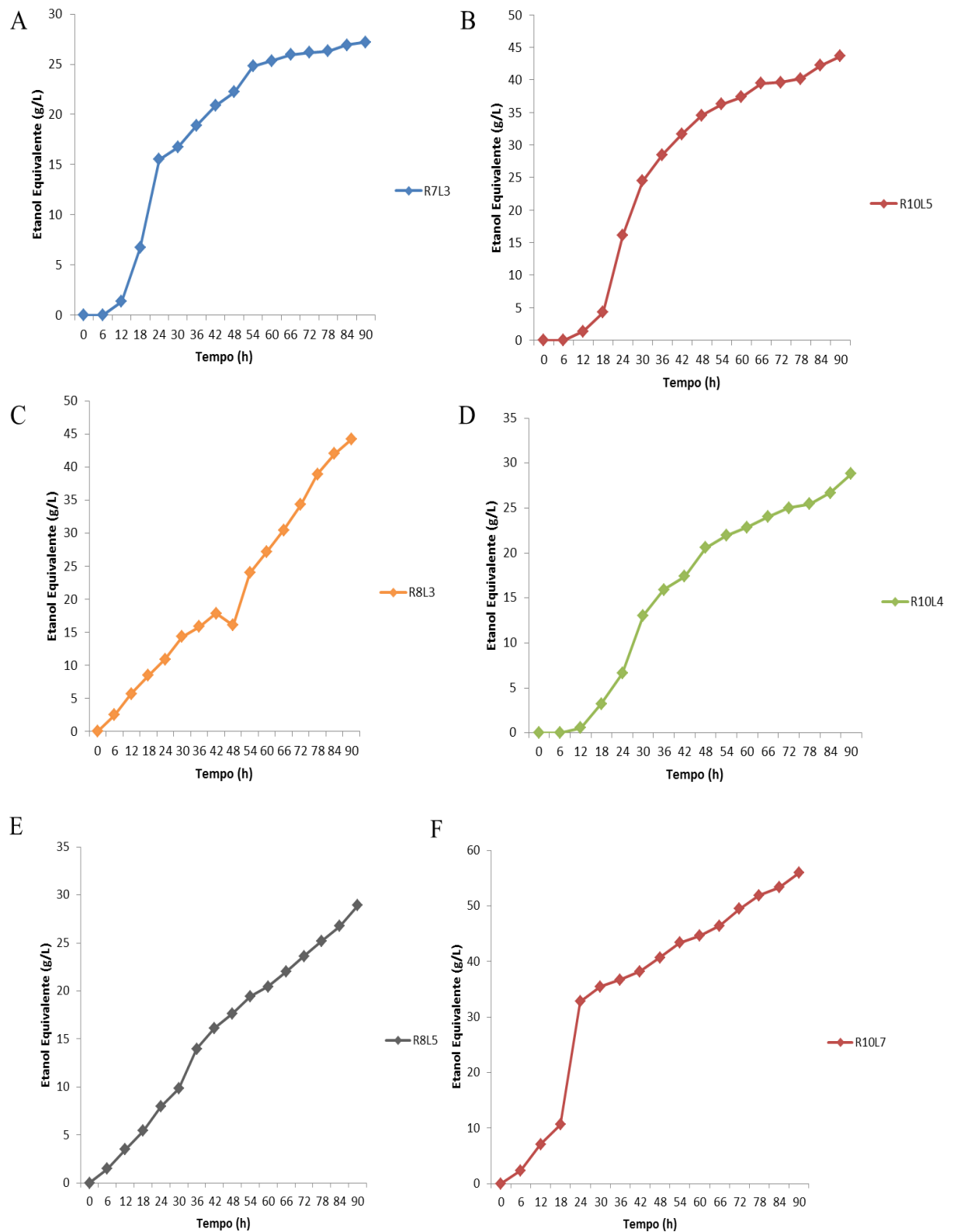
A Equação de Gay-Lussac, que é utilizada na conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono, segue a seguinte fórmula:



MM = 180 g/mol MM = 92 g/mol MM = 88 g/mol

*Massa Molar (MM)

Figura 18 – Produção de etanol pelas leveduras isoladas de insetos fragmentadores da Serra do Tepequém-RR



Legenda: A- R7L3, B- R10L5, C- R8L3, D- R10L4, E- R8L5, F- R10L7 (concentração inicial de 15 g / L) em hidrolisado hemicelulósico de casca de abacaxi (volume total de 100 mL)

Para determinar a concentração de etanol (% v/v) durante a fermentação alcoólica foi realizada o cálculo do rendimento. Para tanto, os valores foram convertidos para massa (% m/v), utilizando o valor da densidade do etanol à 20°C (0,789 g/cm³). Após a transformação de unidades, mais o valor médio de açúcar consumido durante a fermentação, foi determinado o rendimento da fermentação alcoólica, a cepa mais produtora, R8L3, entre dentre as seis selecionadas obteve 44,19 g/L de etanol em 65,56 g/L de açúcar consumido, representando uma eficiência no processo fermentativo de 87,59%. Esses resultados são superiores aos encontrados por Cadete et al. (2012), onde a cepa *Spathaspora xylofermentans* produziu etanol a partir de glicose e xilose com rendimento (YE) de $0,37 \pm 0,02$; $0,34 \pm 0,04$ respectivamente. E semelhante a outras duas espécies de *Spathaspora roraimanensis*, com rendimento: YE/glicose= $0,18 \pm 0,04$ e YE/xylose= $0,29 \pm 0,05$. Para *S. suhii*, o rendimento reduziu: YE / glicose = $0,11 \pm 0,03$ e YE / xylose = $0,14 \pm 0,05$ (CADETE et al., 2012).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das triplicatas das pesagens das leveduras fermentadoras foram corrigidas estatisticamente, utilizando as médias das pesagens de 84 horas de fermentação e submetidas ao teste de Tukey para $p < 0,05$ (Bioestat 5,0). Estatisticamente, as diferenças entre as médias de produção de etanol foram significativas (Tabela 9). Onde a levedura R10L7 foi a mais significativa para produção de etanol, seguida das leveduras R8L3 e R10L5 que não diferiram. As leveduras R8L5, R10L4 e R7L3 apresentaram os menores valores de produção de etanol, que não diferiram entre si.

Reed e Nagodawithana (1991) obtiveram um rendimento de etanol de 0,54 em fermentação aeróbica controlando temperatura, aeração e agitação. Mendes et al. (2013) encontraram resultados similares, somente com aeração controlada e um meio agroindustrial suplementado (caldo de cana de açúcar + extrato de levedura), reduzindo o custo da produção de cachaça. Ambos os trabalhos utilizaram leveduras do gênero *S. cerevisiae* com 96 horas de fermentação. Nos resultados obtidos nesta pesquisa, as leveduras testadas ultrapassaram os dois resultados citados acima, utilizando cepas selvagens em HCA em fermentômetro com temperatura fixa. Onde o

rendimento de etanol em gramas foi obtido pela diferença entre os açúcares totais consumidos e a produção de etanol (Tabela 10).

Tabela 9 – Produção de etanol pelas leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém-RR

Leveduras	Médias de Produção de Etanol (g/L)
R10L7	51.9a
R8L3	42b
R10L5	42.2b
R8L5	26.8c
R10L4	26.7c
R7L3	26.9c

Médias seguidas com letras distintas indicam que os valores diferem entre si $p < 0,05$.

Para que o processo de fermentação seja eficiente são necessários microrganismos específicos com potencial de assimilar pentoses. Leveduras: *Scheffersomyces shehata* (URBINA; BLACKWELL, 2012) e *Spathaspora arborariae* são considerados promissores produtores de etanol, microrganismos considerados ativos no processo de conversão da biomassa.

Tabela 10 – Rendimento de etanol pelas leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém-RR

Leveduras	Rendimento de Etanol (Yp/s)
R10L7	0,81g
R8L3	0,67g
R10L5	0,33g
R8L5	0,44g
R10L4	0,21g
R7L3	0,2g

Neste estudo, as leveduras testadas para a produção de etanol tiveram valores significativos quando submetidas a fermentação com material lignocelulósico. Desta forma, novos estudos podem determinar o potencial destas estirpes no setor dos biocombustíveis. Confirmando assim, as conclusões obtidas por Cadete et al. (2012) e Da Cunha-Pereira et al. (2011) que afirmam que a bioprospecção pode fornecer produtores naturais de etanol com potencial em hidrolisar biomassa lignocelulósica.

5 CONCLUSÕES

Nos dez igarapés estudados foram coletados apenas os gêneros de insetos fragmentadores: *Stenochironomus* e *Phylloicus*. Não houve coleta de insetos do gênero *Triplectides*.

A temperatura da água não teve influência na OD nos corpos hídricos analisados.

A presença de mata ciliar teve uma relação inversa com a ocorrência de fragmentadores.

Foram isoladas 22 leveduras associadas aos insetos fragmentadores, com prevalência no gênero *Stenochironomus*.

A maior frequência de fragmentadores foi verificada no Igarapé Catitu onde se encontra abundância de mata ciliar, substratos variados em águas paradas e turvas; a menor, no igarapé Afluente do Silêncio com águas limpas, leve correnteza, mata ciliar e pouco substrato.

As leveduras isoladas possuem perfil fermentativo para: glicose, maltose, melibiose e galactose, com exceção de um isolado que não apresentou potencial fermentativo.

Todas as leveduras testadas apresentaram perfil termotolerantes, crescendo a 37°C com as mesmas características que em temperaturas mais baixas.

Os isolados apresentaram divisão equitativa nos dois filos, Basidiomicetos e Ascomicetos.

Foram identificadas cinco leveduras dos gêneros *Yamadazyma*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* e *Tremella*, 17 isolados não foram identificados.

As cepas testadas são promissoras para a produção de etanol, utilizando as cascas de abacaxi como substrato, principalmente por não haver necessidade do emprego de hidrólise ácida para a obtenção das fontes de carbono.

REFERÊNCIAS

- ABELHO, M. From Litterfall to Breakdown in Streams: A Review. **The Scientific World Jornal**, [S. l.], v.1, [s. n.], p. 656-680, ago. 2001.
- AGEITOS, J. M. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S.l.], v. 90, p. 1219–1227, abr. 2011.
- ALBUQUERQUE, T. C. S. et al. Estudo para a viabilização e desenvolvimento da fruticultura irrigada no estado de Roraima, Boa Vista: **Embrapa Roraima**, 2010. p. 13 - 15.
- ALENCAR, A. S.; BARROS, J.; MORAES, P. Protocolo Experimental Isolamento de micro-organismos do trato digestório de macroinvertebrados aquáticos da Rede Bionorte. Tocantins: Palmas, 2016. Disponível em: <[http:// www.redebionorte/insetos fragmentadores.com.br](http://www.redebionorte/insetosfragmentadores.com.br)> Acesso em: 03 maio 2017.
- ALTSCHUL et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, n. 17, p. 3389 – 402, set. 1997.
- ALMEIDA, E. L. F. et al. Impactos da contenção dos preços de combustíveis no Brasil e opções de mecanismos de precificação. **Revista de Economia Política**. [S.l.], v. 35, n. 3, p. 531-556. 2016
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S.l.], v. 91, n. 3, p.1267–1275, jul, 2011.
- ANDRADE, J. **SOS sete igarapés urbanos de Boa Vista** – RR, 2011. Disponível em: <<http://sosriosdobrasil.blogspot.com.br>>. Acesso em: 19 maio 2017.
- ANISIMOVA M, GASCUEL O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systemact Biology**, [S.l.], 2006. v. 55, [s.n.] p.539–552.
- ARIMORO, F. O.; IKOMI, R. B.; IWUEGBUE, C. M. A. Water quality changes in relation to Diptera community patterns and diversity measured at an organic effluent impacted stream in the Niger Delta. **Ecological Indicators**, [S.l.], v. 7, n. 2, p.541-542, nov. 2007.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Redwood: Benjamin/Cummings Science Publishing, 1997. 643 p.
- BACH, A. et al. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v.88, n. 8, p.9-21. 2005.

BARBOLA, I. F et al. Avaliação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do rio Pitangui, Paraná. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v.101, n. 1-2, p. 15-23, jun. 2011.

BARBOSA, R. I.; COSTA E SOUZA, J. M.; XAUD, H. A. M. Savanas de Roraima: Referencial Geográfico e Histórico. In: BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A. M.; COSTA E SOUSA, J. M. **Savanas de Roraima Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 11-19.

BARBOSA, R. I.; MIRANDA, I. S. Fitofisionomias e diversidade vegetal das savanas de Roraima In: BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A.; COSTA E SOUZA, J. M. **Savanas de Roraima: Etnoecologia, Biodiversidade e potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005, p. 68-77.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast, characteristics and identification**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2000. 811 p.

BASTIAN, M. et al. Leaf litter diversity and shredder preferences in an Australian tropical rain-forest stream. **Journal of Tropical Ecology**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 219–229. 2007.

BHATT, S.; RANA, R.S.; NAIN, L.R. Ethanol production from mixed fruit juice of damage guava and banana. **Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v.24, n. 4, p.192-193, mar. 1987.

BESERRA NETA, L. C.; TAVARES JÚNIOR, S. S. Geomorfologia do Estado de Roraima por Imagens de Sensores Remotos. In: SILVA, P. R. F. e OLIVEIRA, R. S. (org.). Roraima 20 Anos: **As Geografias de um Novo Estado**. UFRR Boa Vista, 2008. p. 168-192.

BEZERRA-NETO, J. E.; PINTO-COELHO, R. M. O déficit de oxigênio em um reservatório urbano: Lagoa do Nado, Belo Horizonte – MG. **Acta Limnológica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 13, n. 1, p. 107-116, fev. 2001.

BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V. D. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi 'smoothcayenne'. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p.362-367, mar./abr. 2002

BRANCO, R. F. et al. A novel use for sugarcane bagasse. **Biotechnology**, London, v. 29, n. 9, p. 419-425. jul. 2011.

BREUER U., HARMS H. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, [S.l.], v. 30, n. 23, p. 415-37, abr. 2006

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms**. New York: Interscience, 1965. 212 p.

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.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S.l.], v.103, n 4, p. 421–431, fev. 2012.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F. JR.; GRAÇA, M. A. S. Leaf litter as a possible food source for chironomids in headwater streams. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n.2, p. 442–448, jun. 2007.

CANILHA, L.; et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.l.], v. 161, n. 1-8, p.84-92, out. 2009.

CHENG, K. et al. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolentannophilus*. In **Biotechnol lett.** [S.l.], n. 29, p. 1051-1055, out. 2007.

CHI, Z. et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, [S.l.], v. 82, n. 5, p. 793-804; 2009.

CHOONUT, A.; SAEJONG, M.; SANGKHARAK, K. The production of ethanol and hydrogen from pineapple peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. **Energy Procedia**, [S.l.], v. 52, [s.n.], p.242–249, mar. 2014.

COHEN, Z.; RATLEDGE, C. Single Cell Oils. **American Oil Chemists Society Press**, Illinois, v. 6, [s.n.], 12 p, mar. 2005.

CONVERTI, A. et al. Microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus* at different pH values. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 21, [s.n.], p. 719–723, out.1999.

COSTA, D. A. et al. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S.l.], n.8, v. 98, p. 3829–3840, out. 2014.

COSTA, J. M. C. et al. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.2, p.228-232, abr-jun. 2007.

CRESTANI, M. et al. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.6, p.1473-1483, jun. 2010.

CROUS P. W. et al. Fungal pathogens of Proteaceae. **Persoonia**, v. 27, [s.n.], p. 20-45, out. 2011.

DA CUNHA-PEREIRA, F. et al. Conversion of sugar present in Rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their cofermentations. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 102, n. 6 p. 4218-4225. Jun./jul. 2011.

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

DE HOOG, G. S. et al. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, [S.l.], v. 51, [s.n.], p. 33-76, maio, 2005.

DIJCK, P. V. et al. A Baker's Yeast Mutant (fil1) With a Specific, Partially Inactivating Mutation in Adenylate Cyclase Maintains a High Stress Resistance During Active Fermentation and Growth. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. Basel, v. 2, n. 4, p. 521-530, out. 2000.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious v.5.5**. Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand. 2011.

DU PREEZ, J. C. et al. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 16, n. 11, p. 944-956, nov. 1994.

EDGARDO, A. et al. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 43, n. 2, p. 120–123, ago. 2008.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2.ed. Interciência: Rio de Janeiro, 1998. p.195 – 202.

FLINT JR., O. S.; HOLZENTHAL, R.W.; HARRIS S. C. Catalog of the Neotropical Caddisflies (Insecta: Trichoptera). **Journal of the North American Benthological Society**. [S.l.], v. 20, n. 1, p. 239, mar. 2001.

FICKERS P, BENETTI PH, WACHE Y, et al. Hydrophobic sub-strate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**. v.14, n. 5, p. 527–543, abr. 2005.

FULAN, J. A. et al. A variação nictemeral das variáveis físicas e químicas da água influencia a abundância dos macroinvertebrados aquáticos? **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p.150-154, abr./jun. 2009.

GANTER, P. F. Yeast and invertebrate associations. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeast**, Berlin, Springer, 2006. p. 303-370.

GILBERTSON, R. L. Relationships between insects and wood-rotting basidiomycetes. In Fungus-insect relationships. **Columbia University Press**, New York, v. 2, [s. n.], p.130-165, abr. 1984.

GRAÇA, M. A. S. The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – a review. **International Review of Hydrobiology**, [S.l.], v. 86, n. 4-5, p. 383-393, jul., 2001.

GRAÇA, M. A. S.; CRESSA, C. Leaf quality of some tropical and temperate tree species as food resource for stream shredders. **International Review of Hydrobiology**, [S.l.], v.95, p.27-41, fev. 2010.

GUARNER J.; BRANDT M. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. **Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 247-280. 2011.

GUNDE-CIMERMAN, N. Hypersaline water in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiol Ecological**, [S.l.], v. 32, n. 3, p. 235–240, jun. 2000.

HADZIAVDIC, K. et al. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers, **Plos One**, [S. l.], v 9, n. 2, p. 87624, fev. 2014.

HAGLER, A. N. et al. *Wickerhamiella slavikova* sp. and *Wickerhamiella goesii* sp. nov., two yeast species isolated from natural substrates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S.l.], v.63, [s.n.], p. 3099–3103, fev, 2013.

HAGLER A. N., MENDONÇA-HAGLER L C. Diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeast carbon base-urea agar. *Revista Microbiology*. [S.l.], v. 22, n. 1, p. 71–74, nov. 1991.

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**, Manaus: INPA, 2014. 724p.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 100, n.9, p. 1238-1245, maio, 2009.

HOU-RUI, Z. et al. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.l.], v. 152, n. 2, p. 199–212, abr. 2009.

HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology**, [S.l.], v. 21, n. 7, p.1-7, out. 2013.

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**. [S.l.], 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

ISITUA, C. C. et al. Novel method of wine production from banana (*Musa acuminata*) and pineapple (*Ananas comosus*) wastes. **African J Biotechnol**, [S.l.], v.9, n. 44, p.7521–7524. 2014.

JACKMAN, E. A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotechnologia Básica**. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, 1991. 577p.

KOROIVA, R. et al. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.12, n. 8, p. 3421-3434, abr. 2013.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011, p. 87-110.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. **The Yeast, a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998.1088 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 73, n. 4, p. 331-371, out. 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.

LANDEIRO, V. L. et al. Effects of litter patch area on macroinvertebrates assemblage structure and leaf breakdown in Central Amazonian streams. **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 649, p. 355–363, maio, 2010.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and stem pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, [S.l.], v.81, p. 33 - 44, fev. 2002.

LEVANON, Y. **Manual de trabalhos práticos em Bioquímica**. São Paulo, 2003. p.2-8.

LEDESMA, C. et al. Calidad del agua en el embalse Río Tercero (Argentina) utilizando sistemas de información geográfica y modelos lineales de regresión. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 8, n.2, p. 67-76, jan./mar. 2013.

LICHTWARDT, R. W. Trichomycete gut fungi from tropical regions of the world. **Biodiversity and Conservation**, [S.l.], v. 21, n. 9, p. 2397–2402, jan. 2012.

LIS, J. T. Fração de fragmentos de DNA por Precipitação Induzida de Polietileno Glicol. **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 65, p. 347-353. 1980.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity Engineering. **Biotechnology Progress**, [S.l.], v.15, n. 5, p. 777-793, abr. 1999.

MAGNANI, M. et al. Molecular identification of *Aspergillus spp.* isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.3, n. 1, p. 45-49, maio/jun. 2005.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 1 Fundamentos**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2009. Disponível: <<http://www.bteduc.bio.br>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

MAIER, M.H. Considerações sobre características limnológicas de ambientes lóticos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.5, n.2, p.75-90, ago. 1978.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from campinas region, brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n.3, p. 65-70, out. 2007.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “serra gaúcha”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n.24, p. 453-458, jul./set. 2004.

Manual DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis, **Applied Biosystems by life technologies**, 2014. p. 69.

MARTIN, J. H. An identification guide to commom whitefly pest species of the world (Homoptera: Aleyrodidade). **Tropical Pest Management**, [S.I.], v. 33, n. 4, p. 298-322, mar. 1987.

MATOS, I. T. S. R. et al. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites able to ferment d-xylose. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 30, n. 1, p. 260-266, jan./fev. 2014.

MEYBECK, M.; HELMER, R. An introduction to water quality. In. CHAPMAN, D. 1996. **Water quality assessment**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1992. 651p.

MENDES, T. A. O. et al. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 81-89, abr./jun. 2013.

MERICO, A. et al. Fermentative lifestyle in yeast belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, [S.I.], v. 274, n. 4 p. 656-666, jan. 2007.

MILLS, T. Y; SANDOVAL, N. R; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for biofuels**, [S.I.], v.2, n. 26, p. 26, out. 2009.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.I.], v. 11, [s.n.], p. 426-428, ago. 1959.

MORETTI, M. S. et al. Invertebrates colonization on native tree leaves in a neotropical stream (Brazil). **International Review of Hydrobiology**, v. 92, [s.n.], p. 199-210. Ago. 2007.

NARDON, P.; GRENIER, A. M. Endosymbiosis in Coleoptera: Biological biochemical, and genetic aspects. In: SCHWEMMLER, W., GASSNER, G. (Eds.). **Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution**. Boca Raton: CRS Press, 1989, p. 175-216.

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**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 299-306, maio, 2006.

NGUYEN, N. H et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candidajefferriesii* sp. **Mycological Research**, [S.l.], v.110, p.1232–1241, out. 2006.

NOUT M. R., BARTELT R. J. Attraction of a flying nitidulid (*Carpophilus humeralis*) to volatiles produced by yeasts grown on sweet corn and a cornbased medium. **Journal of Chemical Ecology**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 1217–1239, abr.1998.

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, A. L. H.; NESSIMIAN, J. L. *Spatial* distribution and functional feeding groups of aquatic insect communities in Serra da Bocaina Streams, southeastern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 424-441, out. 2010.

OLIVEIRA, L. G. et al. Ecologia de comunidades de insetos bentônicos (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera), em córregos do Parque Ecológico de Goiânia, Góias, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.14, n. 3, p. 867-876, set. 1997.

PAPANIKOLAOU S. et al. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 58, n. 3, p.308–312, mar. 2002.

PARENTE G. D. L. et al. Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi 'pérola' e caracterização da bebida. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 230 - 247, abr./jun. 2014.

PENTEADO, S. R. **Adubação Orgânica - Compostos orgânicos e biofertilizantes**. 2. ed. Campinas: Via Orgânica, 2007. p. 162.

RAMOS, G. R. V. et al. Caracterização química do autolisado de levedura de alambique e avaliação da aceitabilidade do pão de queijo adicionado do autolisado desidratado. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 473-484, maio/jun. 2011.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Biochemical Society Transactions**, [S.l.], v. 30, [s. n.], p.1047-1050, mar. 2002.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast Technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.454 p.

RIBEIRO, L. O. et al. Composição e distribuição de insetos aquáticos no rio Vacacaí-Mirim, Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 79 – 93, out. 2009.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.63-66, jan./ abr. 2001.

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. 53, n. 49, p. 309-318, jan. 1999.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, [S.l.], v.99, n.13, p.5270-5295, dez. 2008.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 74, n. 12, p. 5463-5476, dez. 1977.

SANDERSON, K. Lignocellulose A chewy problem. **Nature**, [S.l.], v.474, n. 7352, p.12-14, jun. 2011.

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

SILVA, D. D. V. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. **Bioforum Europe**, [S.l.], v. 8, [s.n.], p.56-57, jul. 2004.

SILVA, C. G. et al. Adding value to lignins isolated from sugarcane bagasse and *Miscanthus*. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v.42, [s.n.], p. 87– 95, mar. 2012.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, [S.l.], v. 67, n.11, p.918–926, nov. 2008.

SUH, S. O.; BLACKWELL, M. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, Kansas, v. 5, n. 1 p. 87-95, abr. 2004.

SUH, S.-O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel 2 yeasts. **Mycological Research**, [S.l.], v. 109, [s.n.], p 261– 265abr. 2005.

URBINA, H., BLACKWELL, M. Multilocus Phylogenetic Study of the *Scheffersomyces* Yeast Clade and Characterization of the N-Terminal Region of Xylose Reductase Gene, **Plos**, [S.l.], v. 14, n. 20, 26 p. jun. 2012.

VAN DER WALT J. P., HOPSE-HAVU V. K. A colour reaction for the differentiation of ascomycetous and hemibasidiomycetous yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**. [S.l.], v. 42, p. 157–163. set. 1976.

WILKINS M. R. et al. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **ProcessBiochem.** [S.l.], v.43, n. 4, p.346–350, abr. 2008.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Org.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WANTZEN, K. M.; WAGNER, R. Detritus processing by invertebrate shredders: a neotropical–temperate comparison. **Journal of the North American Benthological Society**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 216-232. out. 2006.

WANG Y, REN YC, LI Y et al. Molecular phylogeny and taxonomy of *Yamadazyma dushanensis* f.a., sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species from China. **Curr Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 268 – 73. fev. 2015.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, [S.l.], n.5, v. 24, p. 438-450, mar. 2001.

YARROW, D. Metods 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.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal Biotechnology**, [S.l.], v. 144, n. 1, p. 23-30, out. 2009.

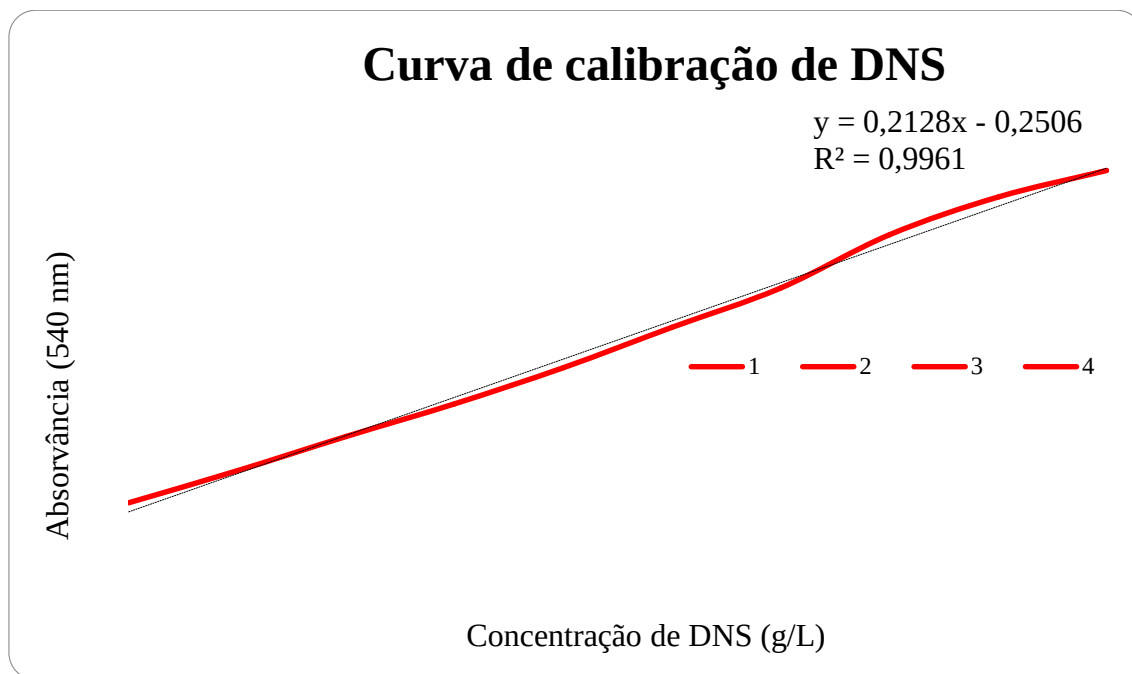
ZOU, Y. Z. et al. Favorable effect of very low initial k (L) a value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. **Journal of bioscience and bioengineering**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 149-52, fev. 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Crescimento e assimilação de fontes de nutrientes por leveduras isoladas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém /RR

[illegible]

APÊNDICE B – Curva padrão de calibração da solução DNS para quantificação dos açúcares redutores totais ARTs.



Apêndice C – Quantificação do DNA de leveduras coletadas de insetos fragmentadores na Serra do Tepequém – RR.

Gêneros de Insetos	Leveduras	Leitura		Razão 260/280	Concentração ng/L
		260 nm	280nm		
<i>Stenochironomus</i>	R4L1	0,671	0,417	1,89	2688,63
<i>Phylloicus</i>	R7L2	1,173	0,814	1,65	45,56
<i>Phylloicus</i>	R7L3	1,153	0,469	2,44	5794,18
<i>Phylloicus</i>	R7L4	0,098	0,035	2,22	574,82
<i>Phylloicus</i>	R7L5	0,127	0,053	2,21	676,81
<i>Stenochironomus</i>	R8L1	0,259	0,138	2,13	1138,46
<i>Stenochironomus</i>	R8L2	0,159	0,073	2,03	844,07
<i>Stenochironomus</i>	R8L3	0,202	0,121	1,87	872,29
<i>Stenochironomus</i>	R8L4	0,232	0,153	1,82	8764,42
<i>Stenochironomus</i>	R8L5	0,061	0,032	1,94	305,82
<i>Stenochironomus</i>	R9L1	0,081	0,047	1,88	370,07
<i>Stenochironomus</i>	R9L2	0,148	0,082	2,01	652,30
<i>Stenochironomus</i>	R9L3	0,377	0,177	2,20	1826,70
<i>Stenochironomus</i>	R9L4	0,141	0,087	1,81	603,34
<i>Stenochironomus</i>	R9L5	0,047	0,044	1,14	123,99
<i>Stenochironomus</i>	R9L6	0,033	0,034	0,93	78,50
<i>Stenochironomus</i>	R9L7	0,100	0,070	1,71	354,50
<i>Stenochironomus</i>	R9L8	0,056	0,052	1,19	121,88
<i>Stenochironomus</i>	R9L9	0,396	0,232	2,08	1578,78
<i>Phylloicus</i>	R10L4	0,237	0,088	2,38	1280,27
<i>Phylloicus</i>	R10L5	0,016	0,002	1,61	181,60
<i>Phylloicus</i>	R10L7	0,690	0,301	2,38	3362,51

APÊNDICE D – Gráfico estatístico das médias das leveduras fermentadoras isoladas de insetos fragmentadores da Serra de Tepequém-RR

