



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA



DIVERSIDADE DE LEVEDURAS CAPAZES DE METABOLIZAR HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO ASSOCIADAS AO INTESTINO DE BESOUROS PASSALÍDEOS
(INSECTA, COLEOPTERA, PASSALIDAE)

ÍTALO THIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS

MANAUS-AM
FEVEREIRO / 2015

ÍTALO THIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS CAPAZES DE METABOLIZAR HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO ASSOCIADAS AO INTESTINO DE BESOUROS PASSALÍDEOS
(INSECTA, COLEOPTERA, PASSALIDAE)

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS-AM
FEVEREIRO / 2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S587d Silveira Rocha Matos, Italo Thiago
DIVERSIDADE DE LEVEDURAS CAPAZES DE METABOLIZAR
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO ASSOCIADAS AO
INTESTINO DE BESOUIROS PASSALÍDEOS (INSECTA,
COLEOPTERA, PASSALIDAE) / Italo Thiago Silveira Rocha Matos.
2015

104 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leveduras. 2. Hidrolisado Hemicelulósico. 3. Passalidae. 4.
Fermentação. 5. Xilose. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

ÍTALO THIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS CAPAZES DE METABOLIZAR HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO ASSOCIADAS AO INTESTINO DE BESOUROS PASSALÍDEOS
(INSECTA, COLEOPTERA, PASSALIDAE)

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Banca examinadora:

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Orientador – Presidente da banca

Prof. Dr. Luíz Antonio de Oliveira
Membro

Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Membro

Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto
Membro

Profa. Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho
Membro

MANAUS-AM
FEVEREIRO / 2015

DEDICATÓRIA

A Maria Luiza, nome que de um samba tirei;
Ao Pedro Enéas, que és Rocha e Matos;
Aos filhos amados, pelos quais todo sacrifício seria pouco;
A estes dedico.

AGRADECIMENTOS

A Rede de Biodiversidade e Biotecnologia para a Amazônia Legal, que através do seu Programa de Doutorado propiciou a realização deste feito;

A Universidade Federal do Amazonas, Instituição da qual tenho a honra de fazer parte do quadro docente, por ter sediado o curso e ter viabilizado a execução do mesmo;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, a qual, através do Edital 021/2011 (Universal Amazonas), financiou parte dos equipamentos e material de consumo utilizados na execução deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro através de taxas de bancada;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fomento a Pós-Graduação;

Ao Centro de Biotecnologia do Amazonas – CBA, através do qual foi possível se executar grande parte das análises cromatográficas/

A Agropecuária Jayoro Ltda., pela cessão do bagaço de cana-de-açúcar para realização deste trabalho;

Aos docentes do Departamento de Genética (ICB/UFAM), pelo companheirismo e prontidão a ajudar sempre que acionados;

Aos colegas do Centro de Apoio Multidisciplinar, pela disposição a ajudar na rotina de laboratório;

A minha aluna e amiga, Verena Makarem Soares, por seu apoio operacional e afetivo;

Ao amigo Edson Júnior do Carmo, por sua amizade e pelas noites mal dormidas empenhadas em efetuar as análises cromatográficas;

A amiga Enedina Nogueira Assunção, por sua amizade e pelo apoio indispensável na obtenção de sequências genômicas de qualidade;

Ao meu orientador e pai, de coração e ciência, Spartaco Astolfi Filho, por seu empenho e apoio no intuito de viabilizar minha formação em nível de mestrado e doutorado;

Aos meus familiares, Antonia Erileuda (mãe), Raimundo Rocha (pai), Gabrielle Matos (irmã), Rizonaldo Pereira (cunhado), Pedro Rocha e Irismar Rocha (avós), Elireuda Rocha e Mauro Félix (tios), por constituírem um porto seguro incondicional;

Aos meus filhos queridos, Maria e Pedro, por seu amor incondicional e por sua paciência em esperar pelo pai quase sempre ausente;

Ao Deus que nos guarda de tropeçar para nos apresentar puros diante da sua glória, ao único Deus, salvador por meio de Cristo, seja a glória, o poder e o reino, antes, agora e para todo sempre.

EPÍGRAFE

E que em mim não haja medo algum,
a não ser o medo de ter medo, e aquele
de que um dia o céu me caia sobre a cabeça.
“Que o céu não caia sobre nossas cabeças”

Sumário

Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
LEVEDURAS: Classificação, Riqueza e Potencial Biotecnológico	2
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: Bioprodutos, Rentabilidade e Entraves	4
DIVERSIDADE / RIQUEZA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS: da assimilação de hemicelulose à fermentação de D-xilose	8
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
OBJETIVOS	15
Objetivo geral	15
Objetivos específicos	15
JUSTIFICATIVA	15
HIPÓTESE	16
CAPÍTULO 1: Análise do Processo de Hidrólise Ácida do Bagaço de Cana-de-Açúcar Produzido em Presidente Figueiredo-AM	17
1.1 Introdução	17
1.2 Material e Métodos	18
1.3 Resultados e Discussão	20
1.4 Conclusões	24
1.5 Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO 2: Isolamento e Identificação de Leveduras Hábeis em Metabolizar Hidrolisado Hemicelulósico e Fermentar D-xilose Associadas a Besouros Xilófagos	27
2.1 Introdução	27
2.2 Material e Métodos	28
2.3 Resultados e Discussão	32
2.4 Conclusões	39
2.5 Referências Bibliográficas	40

CAPÍTULO 3: Produção de Xilitol por <i>Geotrichum sp.</i> VT01 em Fermentação Submersa de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	45
3.1 Introdução	45
3.2 Material e Métodos	46
3.3 Resultados e Discussão.....	48
3.4 Conclusões	52
3.5 Referências Bibliográficas.....	52
CAPÍTULO 4: Caracterização do consumo de Furfural por <i>Geotrichum sp.</i> VT01 em Ensaio de Biotoxificação.....	54
4.1 Introdução	54
4.2 Material e Métodos	54
4.3 Resultados e Discussão.....	57
4.4 Conclusões	64
4.5 Referências Bibliográficas.....	64
CONCLUSÕES GERAIS	66
ANEXOS	67
I. Cromatogramas dos ensaios de hidrólise ácida de bagaço de cana de açúcar	68
II. Cromatogramas do teste de fermentação de D-xilose a etanol e xilitol.....	87
III. Produção Bibliográfica: Revisão de Literatura publicada em forma de Capítulo de Livro	99

Lista de Tabelas

Tabela 1: Variáveis e níveis dos ensaios utilizando delineamento central composto rotacional (Statistica 6.0®).....	17
Tabela 2: Detalhamento dos ensaios de hidrólise ácida.....	18
Tabela 3: Concentrações de D-xilose e rendimentos percentuais obtidos em cada ensaio de hidrólise ácida.....	19
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) de cada variável.....	20
Tabela 5: Perfis bioquímicos dos isolados de <i>V. transversus</i> , identificados segundo <i>ApiWeb</i> (Biomérieux ®).....	33
Tabela 6: Identificação taxonômica dos isolados baseada em máxima identidade a partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos.....	36
Tabela 7: Consumo de D-xilose e Rendimento percentual de xilitol por cada isolado.....	38
Tabela 8: Variáveis e níveis dos ensaios utilizando delineamento central composto rotacional (Statistica 6.0®).....	46
Tabela 9: Detalhamento dos ensaios de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.....	47
Tabela 10: Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar empregado nos ensaios de fermentação.....	48
Tabela 11: Composição final de cada ensaio após 120 horas de fermentação.....	49
Tabela 12: Consumos percentuais dos inibidores ácido acético, furfural e hidróxi-metil-furfural.....	51
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) de cada fator para as variáveis de resposta “rendimento de xilitol” e consumo dos inibidores furfural, hidróxi-metil-furfural e ácido acético.....	51
Tabela 14: Detalhamento dos ensaios de biodetoxificação e consumo de Furfural como fonte única de carbono.....	55
Tabela 15: Detalhamento dos ensaios de caracterização de detoxificação com diferentes fontes de carbono.....	56

Lista de Figuras

- Figura 1:** Levedura isolada do intestino de *Calosoma sp.* (A) Crescimento colonial com aspecto filamentosos; (B) Análise ao microscópio óptico permite a identificação de células de leveduras (aumento 400x). (Fotos: Ítalo T. S. R. Matos) 3
- Figura 2:** Rotas metabólicas para fermentação de D-xilose e L-arabinose. Notar a integração entre a via das pentoses-fosfato e a via glicolítica. São produtos da fermentação de pentoses o xilitol (A) e etanol (B) (adaptado de HANH-HAGERDALL et al., 2007)..... 6
- Figura 3:** Curva padrão para cálculo de concentração de açúcar redutor total pelo método DNS ($y = 0,0131 * x - 0,0329$; $R^2 = 0,9968$)..... 18
- Figura 4:** Gráficos de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis de resposta “Concentração de D-xilose” (A) e “Concentração de Açúcar Redutor Total” (B). Notar efeito negativo do fator “Proporção Sólido – Líquido” sobre ambas as variáveis de resposta..... 20
- Figura 5:** Gráficos de superfície de resposta para a função *desirability* do tratamento de hidrólise ácida para obtenção de ART (g/L) e D-xilose (g/L) segundo a relação entre (A) tempo vs proporção líquido : sólido, (B) proporção líquido : sólido vs concentração de ácido sulfúrico e (C) tempo vs concentração de ácido sulfúrico..... 21
- Figura 6:** Exemplar de *Veturius transversus* em seu estado intacto (A) e posterior a dissecação do tubo digestório (B)..... 28
- Figura 7:** Curva padrão de absorvância entre os níveis 1 e 4 da escala MacFarland..... 29
- Figura 8:** Árvore Filogenética indicando o agrupamento dos isolados em três clados distintos..... 37
- Figura 9:** Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para variável de resposta “Rendimento de xilitol (g/g)”..... 50
- Figura 10:** Gráficos de Pareto de efeitos padronizados para variável de resposta “consumo de hidroximetil-furfural”..... 50
- Figura 11:** Curva padrão para cálculo das concentrações de furfural a partir das áreas dos picos dos cromatogramas..... 56
- Figura 12:** Concentrações de furfural em cada ensaio ao longo de 120 horas de cultivo..... 57

Figura 13: Curvas de crescimento dos ensaios de consumo de furfural.....	58
Figura 14: Cromatograma na faixa do UV, indicando a presença de três picos nas amostras com furfural e glicose (A e C), dois quando D-xilose foi fornecida como fonte única de carbono (B) e um único pico no ensaio controle (D).....	59
Figura 15: Espectrograma de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 0,55 minutos), dos ensaios de consumo de furfural. Note-se a ausência de furfural usando glicose como fonte única de carbono (ensaio GF), e a presença deste quando usadas fontes de carbono xilose (XF), e xilose + glicose (GXF).....	59
Figura 16: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (t/tempo de retenção: 0,87 minutos). Notar composto de peso molecular 161 g/mol presente nos ensaios em que se forneceu furfural a levedura.....	60
Figura 17: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 2,44 minutos).....	60
Figura 18: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 6,16 minutos).....	60
Figura 19: Espectrogramas obtidos por inserção direta das amostras no espectrometro de massas.....	61
Figura 20: Espectrograma da mistura de furfural (PM: 96,8 g/mol) e álcool, evidenciando os produtos da reação com metanol (PM: 110,8 g/mol), etanol (PM: 124,8 g/mol) e isopropanol (PM: 138,8 g/mol).....	63

RESUMO

A associação entre micro-organismos e metazoários foi decisiva para o sucesso evolutivo destes últimos, sobretudo no que se refere a capacidade de digerir e assimilar substratos poliméricos complexos. Admitindo que: i) insetos xilófagos apresentam alta dependência de sua microbiota intestinal; ii) o conteúdo intestinal destes insetos é abundante em espécies ou linhagens ainda não descritas; iii) o conhecimento desta microbiota poderá fornecer ferramentas para obtenção de combustíveis e outros produtos com valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica; o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras, associadas ao conteúdo intestinal do besouro *Veturius transversus* (Passalidae, Coleoptera, Insecta, Arthropoda, Metazoa), hábeis em metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HACA), investigando a seguir a capacidade destas em produzir xilitol neste substrato. Por fim, um dos isolados foi selecionado para caracterização do seu crescimento quando cultivado em HACA. Inicialmente, o processo de hidrólise do bagaço foi analisado quanto à obtenção de açúcar redutor total e D-xilose. A seguir, as leveduras foram isoladas e identificadas segundo o perfil bioquímico e sequências de nucleotídeos de genes ribossomais (ITS). Todos os isolados foram submetidos a teste de produção de etanol e xilitol e, por fim, o isolado VT01 teve seu crescimento em HACA caracterizado. O protocolo de hidrólise de bagaço empregado conduziu, em média, a obtenção de 60,59 g/L de açúcar redutor total, sendo a maior parte deste (71,13%) D-xilose. Um total de 20 colônias de leveduras foram isoladas, distribuídas em 11 perfis bioquímicos e três clados distintos. Exceto os isolados VT12 e VT13 (*Geotrichum sp.*), todos foram hábeis em produzir xilitol. O cultivo de *Geotrichum sp.* (isolado VT01) indicou a habilidade deste em produzir xilitol com rendimento médio de 45,37%, sendo ainda hábil em consumir inibidores do crescimento microbiano gerados durante o processo de hidrólise, a saber, hidroximetil-furfural (83,47%), ácido acético (78,88%) e, principalmente, furfural (98,78%). Face aos resultados, se conclui que: i) os isolados apresentam variedade fisiológica, havendo indivíduos da mesma espécie com perfis bioquímicos divergentes; ii) *Geotrichum sp.* (VT01) é o isolado com maior potencial para produção de xilitol, apresentando maior tolerância aos inibidores do crescimento microbiano; iii) o consumo de furfural por *Geotrichum sp.* (VT01) ocorre em co-metabolismo com glicose, sendo que este inibidor não é utilizado como fonte de carbono para produção de biomassa.

ABSTRACT

Microorganisms and animal association was too important for evolutive success of Metazoa, principally for wood-feeding insects. Assuming that: i) xylophagous insects have symbiotic association to its intestinal microbiota; ii) microbial community of insects gut is a hyperdiverse habitat, with high richness in undescribed strains and species; iii) the knowledge about this microbiota can to provide tools for producing biofuels and other value-added chemical compounds; the aim of this work was to isolate and identify yeasts associated to intestinal content of *Veturius transversus* (Passalidae, Coleoptera, Insecta, Arthropoda, Metazoa), able to metabolize sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate (SBHH) with xylitol production. After this, one of the isolates was selected to have its cultivation in SBHH characterized. Sugarcane bagasse hydrolysis was evaluated about obtaining total reducing sugar and D-xylose. Then, the yeasts were isolated and identified using biochemical profile and the nucleotide sequences of ribosomal genes (ITS). Each isolated strain was evaluated for ethanol and xylitol production, and lastly, the strain named VT01 had its growing in SBHH characterized. The hydrolysis method employed leads to obtaining, on average, 60,59 g/L of total reducing sugar, of which 71,13% is D-xylose. A total of 20 colonies were isolated, being 11 distinct biochemical profiles distributed at 3 clades. Except VT12 and VT13 strains, all isolates are able to producing xylitol, with high yield (average of 45,37%) observed to *Geotrichum sp.* (VT01). Futhermore, *Geotrichum sp.* (VT01) was able to consume the microbial inhibitors acetic acid (78,88 %), hydroxymethyl-furfural (83,47%) and furfural (98,78%). These results allow to conclude that: i) the isolated strains exhibit phenotypic variation, occurring differents biochemical profiles for the same species; ii) *Geotrichum sp.* (VT01) is the most promising isolate for xylitol production, showing high tolerance against microbial inhibitors; iii) furfural consumption by *Geotrichum sp.* (VT01) is performed in co-metabolism with glucose, being not used as carbon source for cell growth.

INTRODUÇÃO

O conhecimento a cerca de biodiversidade tem crescido consideravelmente ao longo das últimas décadas. O advento das tecnologias para estudos genômicos e o aperfeiçoamento de técnicas empregadas em taxonomia clássica têm permitido a correção de equívocos taxonômicos ocorridos no passado, como a separação de espécies distintas anteriormente classificadas em uma única.

Segundo Mora et al. (2011), existem em todos os domínios eucarióticos pelo menos 8,7 milhões de espécies, das quais pelo menos 87% não foram ainda descritas. No âmbito do reino *Fungi*, Blackwell e Spatafora (2004) estimam que pouco mais de 5% das 1.500.000 espécies existentes são conhecidas (~80.000 espécies). Tratando-se especificamente de leveduras, aproximadamente 100 gêneros abrigam menos de 800 espécies, estimando-se no entanto que estas sejam menos de 1% das espécies existentes na natureza (KURTZMAN e FELL, 2004). Quando se lida com habitats remotos, o quantitativo de espécies conhecidas é ainda menor.

Em outra mão, as demandas mundiais por fontes renováveis de energia seguem em crescimento vertiginoso, tendo no etanol oriundo de biomassa uma das principais alternativas ao uso de combustíveis fósseis. Entre os principais gargalos, tem-se especificamente a utilização da fração hemicelulose, devido ao limitado número de espécies hábeis em metabolizar os açúcares resultantes da hidrólise deste heteropolímero. Além de etanol, há outros produtos de valor agregado que podem ser gerados se utilizando hemicelulose como substrato.

Há, portanto, um grande esforço de coleta a ser empreendido com fins quer taxonômicos quer biotecnológicos, pois a biota incógnita pode abrigar em si diversos microorganismos hábeis em agregar valor à biomassa lignocelulósica, cabendo à ciência a busca por estes.

Considerando que estudos recentes indicam o conteúdo intestinal de besouros xilófagos como habitats hiperdiversos, ricos em espécies/linhagens ainda não descritas, muitas das quais fermentadoras de D-xilose, o açúcar mais abundante da fração hemicelulose, o presente trabalho versará sobre a investigação da microbiota intestinal de besouros da

família Passalidae, com o intuito de isolar e caracterizar leveduras hábeis em fermentar D-xilose a etanol ou xilitol

Inicialmente, discorrer-se-á sobre o estado da arte, estruturando a seguir a investigação ora proposta em quatro capítulos, à saber, o primeiro onde a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar é avaliada; o segundo descrevendo o isolamento, seleção e identificação de leveduras associadas a Passalidae; o terceiro, no qual uma levedura selecionada entre os isolados fora avaliada para produção de xilitol; e o quarto, motivado por um resultado do terceiro capítulo, em que se caracteriza o consumo de furfural por uma levedura entre os isolados.

REVISÃO DE LITERATURA

LEVEDURAS: Classificação, Riqueza e Potencial Biotecnológico.

A taxonomia é o ramo da biologia dedicado a classificação dos seres vivos, descrevendo-os em grupos formados por similaridades morfológicas e moleculares, além de buscar inferir a história evolutiva destes. Tradicionalmente, os organismos vivos eram agrupados exclusivamente com base na morfologia e demais características fenotípicas. Este sistema criou alguns equívocos ao longo da história da ciência, como o agrupamento de todos os seres vivos em somente dois grandes reinos: *Metazoa* e *Plantae*. Baseado nesta lógica, a maior parte dos fungos era equivocadamente posicionada no reino vegetal, enquanto os fungos zoospóricos, por exemplo, eram agrupados dentro do reino animal.

Durante a segunda metade do século XX, a proposição de um sistema de classificação que dividia os organismos vivos em cinco reinos foi amplamente difundida e aceita. A partir de então, os fungos integravam o reino *Fungi*, definidos como organismos eucariotos, dotados de parede celular quitinosa, tendo glicogênio como polissacarídeo de reserva (ALEXOPOULOS et al., 1996). No entanto, a condição taxonômica de alguns grupos, como oomicetos e mixomicetos, seguia incógnita, já que estes não atendiam a uma grande parte dos requisitos fenotípicos estabelecidos para as divisões do reino *Fungi*.

Blackwell e Spatafora (2004) descrevem o reino *Fungi* composto por organismos heterotróficos, imóveis, dotados de parede celular e com reprodução, sexuada e/ou assexuada, por esporulação. Os mesmos autores propõem, baseados em filogenética, que *Fungi* seja dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Alexopoulos et al. (1996) consideram a existência do filo-forma Deuteromycota, grupo no qual encontram-se fungos cuja fase de reprodução sexuada e/ou posição taxonômica não seja ainda esclarecida. Atualmente existem cerca de 80.000 espécies de fungos descritas em um total estimado de pelo menos 1,5 milhões de espécies, havendo muitas a serem descobertas, identificadas e inclusas nos inventários taxonômicos (BLACKWELL e SPATAFORA, 2004).

Foco deste trabalho, as leveduras são micro-organismos integrantes do reino *Fungi*, distribuídos entre os filos Ascomycota, Basidiomycota e no filo-forma Deuteromycota. Caracterizam-se por serem predominantemente unicelulares, realizando reprodução assexuada por brotamento e, em alguns casos, por fissão celular (BARNETT, 2004). Eventualmente, algumas espécies de fungos filamentosos podem apresentar forma leveduróide quando submetidos à escassez de O₂ e abundância de CO₂. Apresentam hábito cosmopolita, sendo capazes de colonizar os mais diversos habitats, crescendo em condição sapróbia, comensal, parasita ou inquilina de outros organismos como plantas e animais (STAJICH et al., 2009). Quando cultivadas *in-vitro* formam, tipicamente, colônias com aspecto cremoso ou rugoso, embora algumas espécies apresentem crescimento colonial radial semelhante a fungos filamentosos (Figura 1).

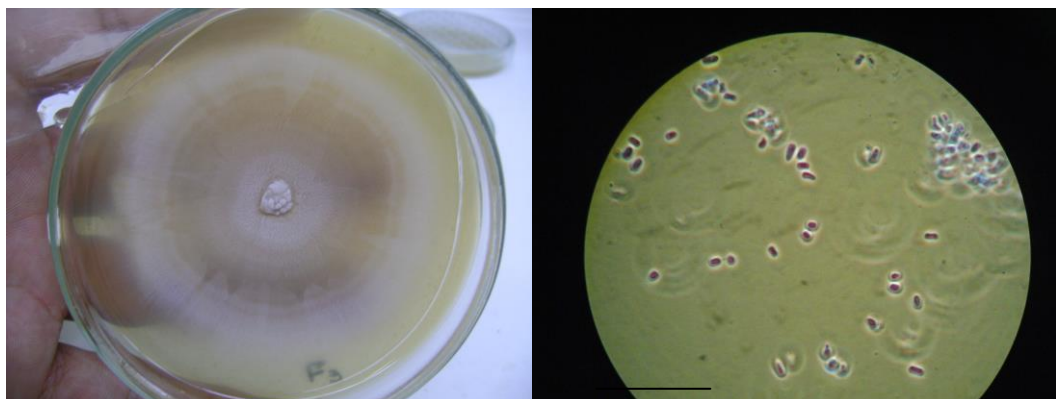


Figura 1: Levedura isolada do intestino de *Calosoma sp.* (A) Crescimento colonial com aspecto filamentosos; (B) Análise ao microscópio óptico permite a identificação de células de leveduras (aumento 400x). (Fotos: Ítalo T. S. R. Matos)

Segundo Barnett (2003), as leveduras foram inicialmente descobertas em processos fermentativos de vinho e cerveja, os quais eram considerados meros processos fisicoquímicos

dos quais elas eram catalisadoras. O desenvolvimento da síntese de substâncias usando somente catalisadores químicos fortalecia o argumento de que o levedo usado na produção de pães, vinhos, cervejas e etanol era apenas um catalisador da reação, e não um organismo vivo. O crescimento do levedo durante a fermentação era ignorado pelos cientistas, os quais desconheciam que o processo fosse efetuado por seres vivos.

Somente em meados dos anos 1830, com o aperfeiçoamento do microscópio óptico, Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing e Theodor Schwann descreveram as estruturas celulares de leveduras, demonstrando serem organismos vivos. A despeito disso, somente trinta anos mais tarde, após diversos debates e embates acalorados e os consistentes trabalhos de Louis Pasteur, a comunidade científica admitiu que as leveduras fossem organismos vivos. A aplicabilidade industrial é um fato marcante entre estas, observado em várias espécies principalmente do subfilo Saccharomycotina (STAJICH et al., 2009).

Entre as aplicações biotecnológicas de leveduras, a fermentação alcoólica é a mais disseminada, sendo empregada pela humanidade desde os tempos mais remotos, na produção de cervejas, vinhos e pães (DEMAIN e SOLOMON, 1981). Estes processos baseiam-se na utilização de hexoses pela via glicolítica para a produção de etanol e dióxido de carbono. O aproveitamento da habilidade das leveduras em fermentar hexoses é amplamente dominado pela indústria. Entretanto, um limitado número de espécies conhecidas é capaz de fermentar pentoses a etanol, o que torna a busca por novas espécies/linhagens microbianas selvagens dotadas desta habilidade um importante passo (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: Bioprodutos, Rentabilidade e Entraves.

Denomina-se biomassa lignocelulósica o conjunto dos polímeros estruturais presente nos vegetais, sendo estes a lignina, a celulose e a hemicelulose. O primeiro tem função basicamente de sustentação e proteção mecânica, conferindo consistência lenhosa aos tecidos em que se impregna. Serão focos desta secção os dois últimos por conta de terem maior aplicabilidade aos processos fermentativos.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, consistindo em um homopolímero de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta - 1,4$. A hidrólise

por enzimas da família das celulasas gera monômeros de glicose que, conforme mencionado anteriormente, são facilmente metabolizados pelas leveduras tanto para produção de biomassa microbiana quanto para fermentação alcoólica.

A hemicelulose, o segundo mais abundante polissacarídeo da biomassa vegetal, é um heteropolímero composto por hexoses e pentoses, com destaque para estas últimas. É formado por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. A proporção de cada carboidrato também é variável, mas a xilose ocupa sempre lugar de destaque, podendo representar até 89,3% dos monômeros componentes da hemicelulose em alguns tipos de madeira (SAHA, 2003).

A quantidade de hemicelulose em cada tipo de vegetal é variável de acordo com a espécie e as condições ambientais de cultivo. Este polímero está presente em diversos tipos de resíduos agroindustriais, podendo constituir substrato abundante e de baixo custo para a obtenção de produtos biotecnológicos tais como xilitol, etanol e proteína celular microbiana. A utilização da fração hemicelulósica da biomassa para obtenção de produtos com valor agregado reduziria a liberação de resíduos sólidos para o meio ambiente e seria interessante do ponto de vista econômico, devido ao baixo custo dos resíduos e o valor de mercado dos produtos.

O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2006), tem o caldo de cana como principal fonte de carbono para fermentação alcoólica. Por conseguinte, o bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante resíduo agrícola brasileiro, tendo sido produzidas 173,5 milhões de toneladas deste somente em 2009 (MATOS et al., 2012). Estima-se que na safra 2012/2013 foram produzidas pelo menos 588.915.700 toneladas de cana-de-açúcar, das quais se produziram 23,6 milhões de litros de etanol (BRASIL, 2013). Admitindo que um quarto de toda cana produzida resulte em bagaço, restaram pelo menos 147 milhões de toneladas deste resíduo.

Segundo Goldemberg (2008), o bagaço contém cerca de um terço de toda a energia da cana de açúcar. Sua utilização para fermentação alcoólica poderá, por exemplo, elevar a produção de etanol do Brasil entre 7 e 12% (TAKAHASHI et al., 2000). Para Rossell (2007) o domínio da tecnologia de fermentação do bagaço e da palha de cana-de-açúcar pode elevar a produção de etanol em até 40%, sem a necessidade de aumentar a área plantada em único hectare até 2025.

A composição do bagaço é variável de acordo com as condições de cultivo do canavial, mas cerca de 35% deste corresponde a hemicelulose (TAKAHASHI et al., 2000). Diversos trabalhos citam D-xilose como o açúcar mais abundante da fração hemicelulósica do bagaço. Cheng et al. (2007) obtiveram xilose em fração superior a 50% dos componentes resultantes da hidrólise ácida de bagaço de cana.

Admitindo os valores propostos por Saha (2003) e Cheng et al. (2007), e considerando que fossem utilizadas as 30,4 milhões de toneladas de D-xilose produzidas pelo Brasil em 2009, em uma estimativa teórica seriam produzidas até: 12,6 milhões de toneladas de etanol; 30,4 milhões de toneladas de xilitol ou 20 milhões de toneladas de extrato de leveduras. Tal rentabilidade, no entanto, esbarra no principal fator limitante: o pequeno número de espécies conhecidas hábeis em efetuar a rota metabólica de fermentação de pentoses (figura 2).

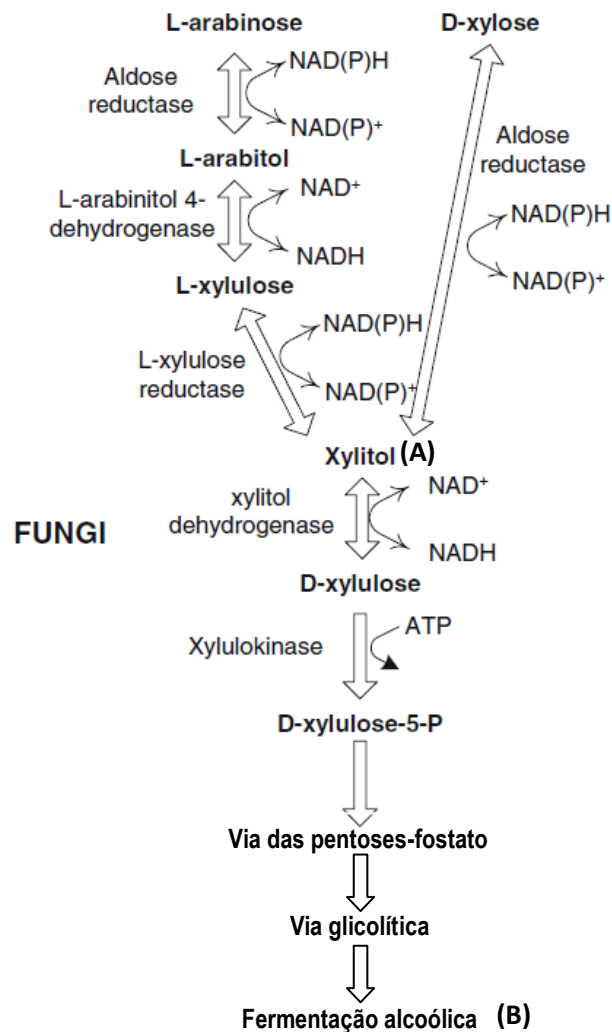


Figura 2: Rotas metabólicas para fermentação de D-xilose e L-arabinose. Notar a integração entre a via das pentoses-fosfato e a via glicolítica. São produtos da fermentação de pentoses o xilitol (A) e etanol (B) (adaptado de HANH-HAGERDALL et al., 2007).

O xilitol é o principal produto da fermentação de pentoses alternativo ao etanol. Este polioliol tem demonstrado eficiência na redução de cárie dental (SAHA, 2003), no controle de otites do ouvido médio (AZARPAZHOOH et al., 2011), e potencial adoçante idêntico ao da sacarose, embora tenha somente 60% das calorias deste dissacarídeo (ARANDA-BARRADAS et al., 2010), podendo ser usado para conferir sabor a alimentos destinados a dietas hipocalóricas.

A fração hemicelulose e seus derivados não estão prontamente acessíveis à assimilação e fermentação por micro-organismos dotados desta habilidade. Entre o estado polimérico da biomassa e os açúcares fermentescíveis, encontram-se os principais gargalos tanto do ponto de vista químico/bioquímico como financeiro. A hidrólise é o processo empregado para sacarificação, isto é, tornar os carboidratos poliméricos em açúcares solúveis disponíveis à fermentação. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser hidrolisado por meio de auto-hidrólise, hidrólise enzimática e hidrólise ácida.

A auto-hidrólise consiste em tratamento por choque térmico a temperaturas superiores a 190 °C, resultando na conversão de hemicelulose a xilo-oligossacarídeos. A hidrólise enzimática é feita pela mistura de certa quantidade de enzimas ao substrato lignocelulósico, liberando açúcares fermentáveis. O problema destes processos está principalmente no custo, pela intensa demanda de calor, necessária à auto-hidrólise, e o preço elevado das enzimas, bem como os gastos na manutenção de temperatura e pH ótimos a atividade enzimática. Além disso, as enzimas hemicelulolíticas não podem ser usadas na hidrólise direta, pois são inibidas pela estrutura cristalina da lignocelulose, sendo necessário empregar pré-tratamento físico e/ou químico para obtenção de hidrólise completa (PANDEY et al. 2000; WHITE et al. 2008; CANILHA et al. 2009).

A utilização de ácidos inorgânicos diluídos, como HCl, HNO₃ e H₂SO₄, levam à hidrólise quase completa da fração hemicelulósica em unidades monoméricas de pentoses e hexoses (WHITE et al. 2008). Este processo gera muitos inibidores ao crescimento microbiano, como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos fórmico, levulínico e acético. Para tornar o crescimento microbiano viável, diversas técnicas de detoxificação podem ser empregadas. Entre estas temos centrifugação, filtração, adição de carvão ativado, eletrodialise, adição de hidróxido de cálcio e biodetoxificação (CANILHA et al. 2009; HOU-

RUI et al. 2009). Algumas técnicas de detoxificação podem ainda provocar a redução na concentração de açúcar redutor entre 5 e 12% (CANILHA et al. 2009).

O emprego de técnicas simples para detoxificação de hidrolisados hemicelulósicos leva a obtenção de substratos com elevados teores de inibidores, podendo ser empregados como meios seletivos para micro-organismos de alta resistência. Esta característica pode baratear os produtos biotecnológicos baseados em hidrolisados hemicelulósicos, haja vista a redução nos investimentos necessários à detoxificação.

A diversidade de leveduras amazônicas, em seu estado incógnito, pode conter em si diferentes espécies dotadas de tais habilidades e aplicáveis à obtenção dos produtos supracitados. Esforços têm sido empreendidos no intuito de localizar na natureza espécies com tal habilidade, conforme visto adiante.

DIVERSIDADE / RIQUEZA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS: da assimilação de hemicelulose à fermentação de D-xilose.

Conforme descrito, a obtenção de produtos biotecnológicos baseados em hemicelulose tem perspectivas promissoras, mas que demandam muito esforço de pesquisa especialmente no que se refere aos micro-organismos hábeis em metabolizar esse substrato e seus derivados. A pergunta que se tenta responder é: como a diversidade microbiana da Amazônia se posiciona num contexto de obtenção destes produtos?

A condição megadiversa do bioma Amazônia é amplamente conhecida e difundida, restando muito desconhecimento sobre o número de espécies que compõem essa diversidade. Diversos trabalhos científicos versam sobre a busca por micro-organismos e/ou processos que conduzam a obtenção de produtos biotecnológicos baseados em hemicelulose (MATOS, 2010).

Em um extenso levantamento bibliográfico, diversos artigos relatam a construção e emprego de micro-organismos recombinantes. Poucos trataram do isolamento e utilização de leveduras selvagens para utilização de hemicelulose, sendo que, em nenhum dos casos, o isolamento foi efetuado a partir de habitats amazônicos.

Igualmente escasso é o número de trabalhos científicos atuais que tratam da riqueza de espécies microbianas da Amazônia. A megadiversidade amazônica encontra-se, portanto, em condição incógnita, e aparentemente continuará assim por um período longo. Esta expectativa se baseia no fato de que poucos grupos de pesquisa têm se dedicado a tal tarefa, sendo menor ainda o número de grupos que busca a aplicação destas espécies aos propósitos anteriormente descritos.

Entre os estudos efetuados objetivando o isolamento de espécies de leveduras selvagens hábeis em metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e fermentar D-xilose na Amazônia Brasileira, os resultados são animadores.

Cadete et al. (2013) descreveram quatro novas espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose, pertencentes ao clado *Spathaspora*, associadas a madeira em decomposição no estado de Roraima.

Utilizando meio de seletivo composto de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, Cassa-Barbosa (2012) isolou 45 colônias associadas ao intestino de larvas de Cerambycidae e Scarabaeidae (Artropoda, Insecta, Coleoptera) coletados na Amazônia Central. Estas colônias foram identificadas em quatro espécies distintas, a saber, *Candida lignohabitans*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Trichosporon mycotoxinivorans*.

Matos (2010) avaliou quatro diferentes biótopos na Amazônia Brasileira: solos de savanas no estado de Roraima, solos de matas de terra firme no estado do Amazonas, conteúdo intestinal de cupins (*Nasutitermes sp.*) e besouros dos gêneros *Calosoma* (Artropoda, Insecta, Coleoptera, Carabidae).

As amostras de solo foram escolhidas como habitats em potencial para as leveduras de interesse levando em conta o volume de biomassa lignocelulósica que é decomposto pela atividade microbiana. Quanto aos insetos, os cupins (*Nasutitermes sp.*) foram selecionados em função da xilofagia, isto é, alimentam-se basicamente de madeira. Considerando que menos de 10% das enzimas empregadas na digestão da madeira é produzida pelos cupins (BREZNAK, 1982), a tese de que encontrar-se-iam leveduras hemicelulolíticas nestes insetos pareceu razoável. *Calosoma* é um gênero de besouros carnívoros, mas que apresentam hábito alimentar xilófago durante a fase larval (LIMA, 1945). Segundo Suh et al. (2005), o intestino

de besouros é um habitat inexplorado, e hiperdiverso em espécies de leveduras ainda não descritas.

Para o isolamento das leveduras, o meio seletivo foi produzido utilizando hidrolisado ácido hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HACA) como fonte única de carbono, conforme descrito por Matos et al. (2012). Considerando que o pré-tratamento empregado gera grande quantidade de inibidores do crescimento microbiano, o meio obtido tinha elevado poder de seleção de leveduras hábeis em metabolizar hemicelulose e tolerantes a inibidores.

Duas espécies foram identificadas como fermentadoras de D-xilose com retenção de gás em tubos de Durham, à saber, *Meyerozyma guilliermondii* (GenBank JN974905.1) e *Trichosporon mycotoxinivorans* (GenBank JX861097.1). Apesar do resultado positivo no teste com tubos de Durham, não houve evidências analíticas de que estes isolados produzissem etanol. Isto se explica tendo em vista que a habilidade em produzir etanol a partir de D-xilose é pouco disseminada na natureza, enquanto a produção de xilitol é mais amplamente distribuída.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Observa-se que o crescimento dos inventários taxonômicos esbarra principalmente na escassez de recursos humanos. Trabalhos realizados em curtos espaços de tempo proporcionaram a identificação de novas espécies e as primeiras descrições de ocorrência de espécies com potencial biotecnológico na utilização de lignocelulose para obtenção de etanol, xilitol e biomassa microbiana. Para que estas espécies / linhagens sejam conduzidas dos potenciais à real utilização em bioprocessos, muito esforço de pesquisa deve ser empreendido, o que demandará novos investimentos e, principalmente, recursos humanos.

Em função de sua megadiversidade, a ainda pouco conhecida microbiota Amazônica poderá constituir extensa fonte de micro-organismos aplicáveis para os mais diversos fins, seja na produção de enzimas industriais, tratamento de efluentes, produção de biocombustíveis, ou ainda como hospedeiros ou fontes de genes de interesse à engenharia metabólica, contribuindo assim para geração de renda aos povos amazônicos e criando condições para minimizar a necessidade de desflorestamento.

Os esforços de pesquisa agora se concentram no estudo da microbiota intestinal de besouros xilófagos, baseado na hipótese de ser este um habitat hiperdiverso, rico em espécies de leveduras ainda não descritas e potenciais fermentadoras de D-xilose

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4^a ed. John Wiley & Sons, New York. 880 pp.
- AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H.; LAWRENCE, H. P.; SHAH, P. S. (2011). Xylitol for preventing acute otitis media in children up to 12 years of age. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*. 11: CD007095.
- BARNETT, J. A. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*. 149: 557–567.
- BARNETT, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*. 21: 1141–1193.
- BLACKWELL, M.; SPATAFORA, J. W. (2004). Fungi and their allies, p. 7-22. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (Eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- BRASIL. (2013). Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, abril/2013*. Brasília : Conab.
- BREZNAK, J. A. (1982). Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Reviews of Microbiology*. 36: 323-343. 1012 pp.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. (2013). *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*. 103: 421–431. DOI 10.1007/s10482-012-9822-z

- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. (2009). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-009-8792-8.
- CASSA-BARBOSA, L. A. (2012). *Isolamento e Caracterização de Leveduras Fermentadoras de Pentoses da Biodiversidade Amazônica*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 74 pp.
- CHENG, K. K.; GE, J. P.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; YANG, M. D.; XU, J. M. (2007). Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology letters*. 29: 1051-1055.
- CUNHA, A. F.; MISSAWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F.; PEREIRA, G. A. G. (2006). Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Research*. 6: 280–287.
- DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. (1981). Industrial microbiology: Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. *Scientific American*. 245 (3): 43–52.
- GOLDEMBERG, J. (2008). The Brazilian Biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*. DOI:10.1186/1754-6834-1-6.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 937–953.
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S. S.; SARROUH, B. F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J.; QIU, X. (2009). Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152: 199–212.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (2004). Yeasts, p. 337-342. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

- LIMA, M.C. (1945). Coleópteros. In: *Insetos do Brasil*. p. 257-269. Tomo 7, Rio de Janeiro, Escola Nacional de Agronomia.
- MATOS, I. T. S. R. (2010). *Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 68 pp.
- MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; COSTA NETO, P. Q.; ASTOLFI FILHO, S. (2012). Cultivation of *Trichosporon mycotoxinivorans* in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate. *Electronic Journal of Biotechnology*. 15 (1).
- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*. 9 (8): e1001127. DOI:10.1371/journal.pbio.1001127
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 74: 69–80.
- ROSSELL, C. E. V. (2007). O futuro energético do país está no bagaço. In: *Jornal da UNICAMP*. 05 a 11 de março de 2007. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- SAHA, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 279–291.
- STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y. SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*. 19 (18): 840-845.
- SUH, S. O.; MCHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M. (2005). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological Research*. 109 (3): 261–265.
- TAKAHASHI, C. M.; LIMA, K. G. C.; TAKAHASHI, D. F.; ALTERTHUM, F. (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16: 829-834.

WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G. M. (2008). Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Research*, 8: 1175–1184.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar e identificar leveduras amazônicas associadas ao intestino de besouros passalídeos segundo a habilidade destas em metabolizar hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar e fermentar D-xilose; verificando a identificação taxonômica e as relações filogenéticas das mesmas.

Objetivos específicos

- Isolar leveduras selvagens associadas ao trato digestório de besouros passalídeos (Passalidae, Coleoptera, Insecta) segundo a capacidade destas de metabolizar hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar como fonte única de carbono;
- Efetuar a identificação taxonômica dos besouros;
- Efetuar a identificação taxonômica das leveduras isoladas;
- Analisar as relações filogenéticas das leveduras isoladas;
- Selecionar linhagens fermentadoras de D-xilose;
- Analisar os fatores com efeitos significativos para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;
- Quantificar a produtividade de xilitol a partir da fermentação de D-xilose em hidrolisado hemicelulósico.

JUSTIFICATIVA

Atualmente, estima-se que exista cerca de 1,5 milhões de espécies no reino *Fungi*, sendo que somente 7% destas são conhecidas. Quando se avalia micro-habitats, o desconhecimento desta diversidade é ainda maior. Considere-se ainda o limitado número de espécies fermentadoras de D-xilose.

Justifica-se a execução deste projeto já que o mesmo empenhar-se-á em conhecer a diversidade de leveduras do conteúdo intestinal de Passalidae na região amazônica, além de selecionar linhagens / espécies de interesse biotecnológico, sobretudo na utilização de substratos derivados de lignocelulose.

HIPÓTESE

A microbiota associada a besouros Passalidae da Amazônia Central é rica em espécies de leveduras hábeis em metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose a etanol e/ou xilitol.

CAPÍTULO 1: Análise do Processo de Hidrólise Ácida do Bagaço de Cana-de-Açúcar Produzido em Presidente Figueiredo-AM.

1.1 Introdução

O Brasil é maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o bagaço desta o seu principal resíduo agrícola (CUNHA et al., 2006). Estima-se que na safra 2013-2014 foram produzidas cerca de 164,7 milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar (BRASIL, 2014).

A composição do bagaço é variável de acordo com as condições ambientais, mas em média de 20 a 40% do bagaço de cana-de-açúcar corresponde a hemicelulose (SAHA, 2003). Esta fração da biomassa é formada por polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. Hemicelulose é o segundo mais importante polissacarídeo estrutural dos vegetais superiores, sendo menos abundante apenas que a celulose.

Através de diferentes tipos de pré-tratamento (auto-hidrólise, hidrólise enzimática, alcalina ou ácida), os açúcares que integram os polímeros da biomassa tornam-se disponíveis à fermentação por micro-organismos. Estes pré-tratamentos geram também diversos inibidores do crescimento microbiano (WHITE et al., 2008), demandando o emprego de técnicas para detoxificação (CANILHA et al., 2009; HOU-RUI et al., 2009). A utilização de técnicas simples torna o hidrolisado hemicelulósico rico em inibidores, o que faz deste substrato um meio de alta seletividade.

Diversos protocolos para hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar são descritos, conduzindo a diferentes resultados na obtenção de açúcares fermentescíveis. Ensaio anteriores (MATOS, 2010; CASSA-BARBOSA, 2012; MATOS et al., 2012; MATOS et al., 2014) foram executados se utilizando 4 mL de ácido sulfúrico (3% v/v) para cada grama de bagaço de cana de açúcar. Em ensaios recentes, esta razão se mostrou insuficiente para hidrolisar toda a amostra, restando bagaço seco em alguns ensaios. Face ao exposto, se fez necessário usar 5 mL de ácido sulfúrico para cada 1 g de bagaço.

Considerando que as particularidades regionais podem interferir nas características físico-químicas do bagaço e que o protocolo ajustado não fora analisado do ponto de vista do delineamento experimental, o objetivo deste capítulo foi analisar a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar produzido no município de Presidente Figueiredo-AM, identificando o efeito dos diferentes fatores sobre a obtenção de açúcares redutores totais e D-xilose.

1.2 Material e Métodos

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado nas dependências da Agropecuária Jayoro Ltda., município de Presidente Figueiredo-AM (02°02'04" S – 60°01'33" W). O mesmo foi lavado para remoção de resíduos de sacarose, desidratado a 70 °C até obtenção de peso constante e triturado (tamanho de partícula < 2,0 mm).

A hidrólise foi executada misturando-se o bagaço a ácido sulfúrico diluído, submetendo esta mistura a tratamento térmico (121 °C). A avaliação dos efeitos de cada fator para o processo de hidrólise foi executada utilizando delineamento central composto rotacional (DCCR) com três variáveis em três níveis, conforme tabela 1. Para fins de análise estatística, o fator razão sólido : líquido (g : mL) foi identificado como proporção líquido : sólido, isto é, o volume de líquido (mL) empregado para cada unidade de massa (1 g) de bagaço de cana de açúcar.

Tabela 1: Variáveis e níveis dos ensaios utilizando delineamento central composto rotacional (Statistica 6.0®).

Variáveis	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	1,32	2	3	4	4,67
Tempo de tratamento térmico (min)	20	20	40	60	60
Proporção líquido : sólido	3,82 : 1	4,3 : 1	5 : 1	5,7 : 1	6,17 : 1

O delineamento experimental foi executado em um total de 17 ensaios, conforme detalhamento da tabela 2, sendo variáveis de resposta as concentrações de açúcares redutores totais ([ART], g/L) e D-xilose ([D-Xilose], g/L). Após o tratamento térmico, o conteúdo de cada ensaio foi prensado (até 15 toneladas), descartando-se a fase sólida e recuperando-se a fase líquida, a qual foi neutralizada (pH 5,0) pela adição de Ca(OH)₂.

A concentração de açúcar redutor total foi determinada pelo método DNS, se misturando 200 µL da amostra (diluída 100x) a 300 µL de solução de ácido di-nitro-salicílico (DNS). Após fervura por 5 minutos, foram adicionados 1500 µL de água destilada e se procedeu a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A concentração foi calculada usando a fórmula $[ART] = (ABS + 0,0329)/0,0131$, conforme determinado pela curva padrão apresentada na figura 3.

Tabela 2: Detalhamento dos ensaios de hidrólise ácida.

Ensaio	[H ₂ SO ₄] (%)	Proporção líquido : sólido	Tempo de tratamento térmico (min)	Grau de severidade
1	2	4,3	20	1,25
2	2	4,3	60	1,73
3	2	5,7	20	1,25
4	2	5,7	60	1,73
5	4	4,3	20	1,25
6	4	4,3	60	1,73
7	4	5,7	20	1,25
8	4	5,7	60	1,73
9	1,31	5,0	40	1,55
10	4,69	5,0	40	1,55
11	3	3,8	40	1,55
12	3	6,2	40	1,55
13	3	5,0	6,4	0,76
14	3	5,0	73,6	1,82
15 (c)	3	5,0	40	1,55
16 (c)	3	5,0	40	1,55
17 (c)	3	5,0	40	1,55

Legenda: (c) – Ponto central

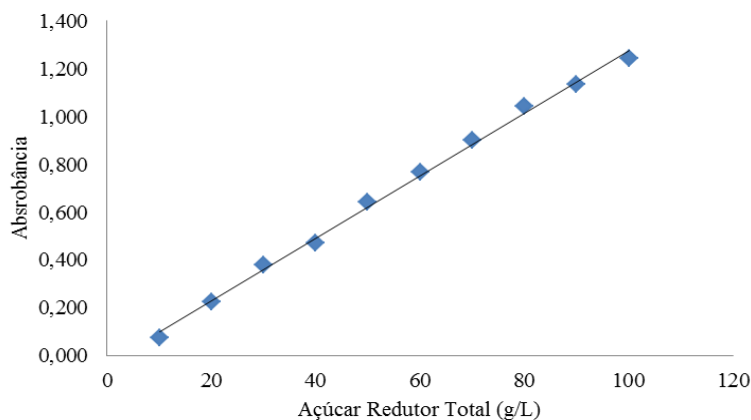


Figura 3: Curva padrão para cálculo de concentração de açúcar redutor total pelo método DNS ($y = 0,0131 * x - 0,0329$; $R^2 = 0,9968$).

As concentrações de D-xilose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando coluna *Luna amino 100A* (Phenomenex: 150 x 4,6 mm; diâmetro de partícula 5,0 µm; fase móvel água : acetonitrila em razão 1:3; detector de índice de refração modelo RID-10A, Shimadzu). A partir dos cromatogramas obtidos (anexo I), foram calculadas as concentrações aplicando-se a fórmula: $[X] = (S_A \cdot [P]) / S_P$, onde $[X]$ é a concentração de xilose na amostra, S_A é a área do pico da amostra, $[P]$ é a concentração do padrão e S_P é a concentração de xilose na solução padrão, conforme descrito por Betancur (2010).

O grau de severidade (Sf) foi calculado segundo a fórmula $Sf = \text{Log}\{ t * [(T - 100)/14,75] \} - \text{pH}_f$, onde “t”, corresponde ao tempo de exposição (minutos), “T” a temperatura utilizada no tratamento (°C) e “pH_f” o pH final (SCHELL et al., 2003).

1.3 Resultados e Discussão

As maiores concentrações de D-xilose (53,59 g/L) e Açúcar Redutor Total (75,85 g/L) foram obtidas nos ensaios 1 e 11, respectivamente. Observe-se que em ambos os ensaios, são empregadas as menores proporções de líquido, correspondendo aos níveis -1 e -α. As concentrações de ART e D-xilose obtidas em cada ensaio são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de ART e D-xilose obtidas em cada ensaio de hidrólise ácida.

Ensaio	[ART] (g/L)	[D-xilose] (g/L)
1	62,87	53,59
2	65,37	48,47
3	51,44	41,76
4	52,23	43,17
5	55,54	47,81
6	54,23	45,32
7	47,34	40,40
8	59,03	38,76
9	51,88	38,93
10	69,94	43,93
11	75,85	47,68
12	52,83	40,70
13	51,13	43,19
14	66,10	46,34
15	70,69	36,76
16	71,80	36,81
17	71,68	39,15

A análise de variância (ANOVA) permitiu concluir que, quer para a variável de resposta “[ART] (g/L)”, quer para “[D-Xilose] (g/L)”, o fator “Proporção líquido : sólido” apresentou efeito linear significativo ($p < \alpha$), havendo também efeito significativo quadrático do fator “tempo”. Houve ainda efeito significativo da variável quadrática “Proporção líquido : sólido” sobre a concentração de D-xilose, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) de cada variável.

Variáveis	Valor de “p” para cada variável de resposta ($\alpha = 0,05$)	
	[ART] (g/L)	[D-Xilose] (g/L)
(1) [Ácido] (L)	0,587289	0,610087
[Ácido] (Q)	0,055676	0,134833
(2) Proporção Líquido : Sólido (L)	0,035567	0,008353
Proporção Líquido : Sólido (Q)	0,131861	0,029881
(3) Tempo (L)	0,174043	0,835395
Tempo (Q)	0,031369	0,021983
R ²	0,75018	0,79331

Para ambas variáveis de resposta, o fator “proporção líquido : sólido” apresentou efeito negativo, indicando que o emprego de maior volume de líquido por grama de bagaço implica em menores concentrações tanto de ART quando de D-xilose, conforme apresentado na figura 4.

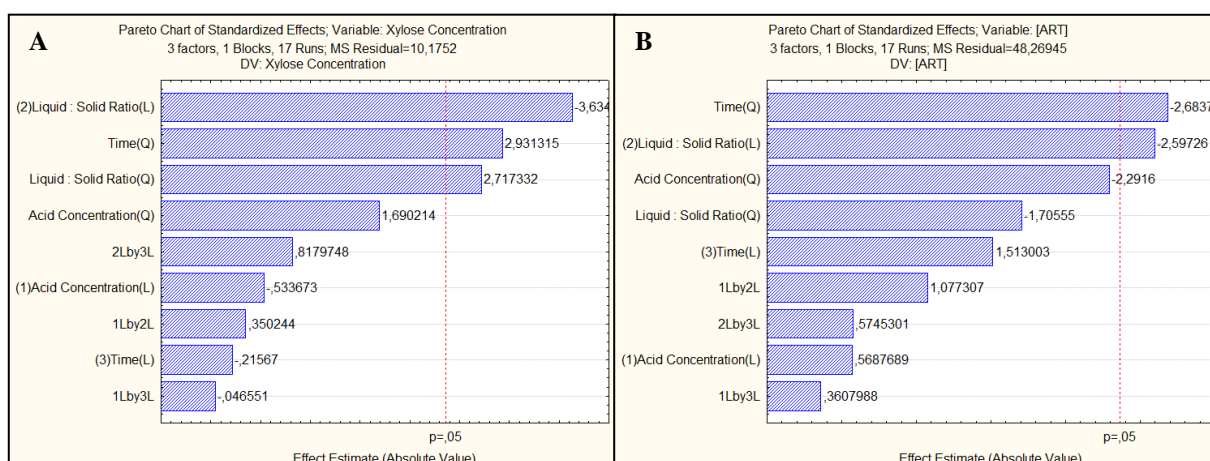


Figura 4: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis de resposta “Concentração de D-xilose” (A) e “Concentração de Açúcar Redutor Total” (B). Notar efeito negativo do fator “Proporção Sólido – Líquido” sobre ambas as variáveis de resposta.

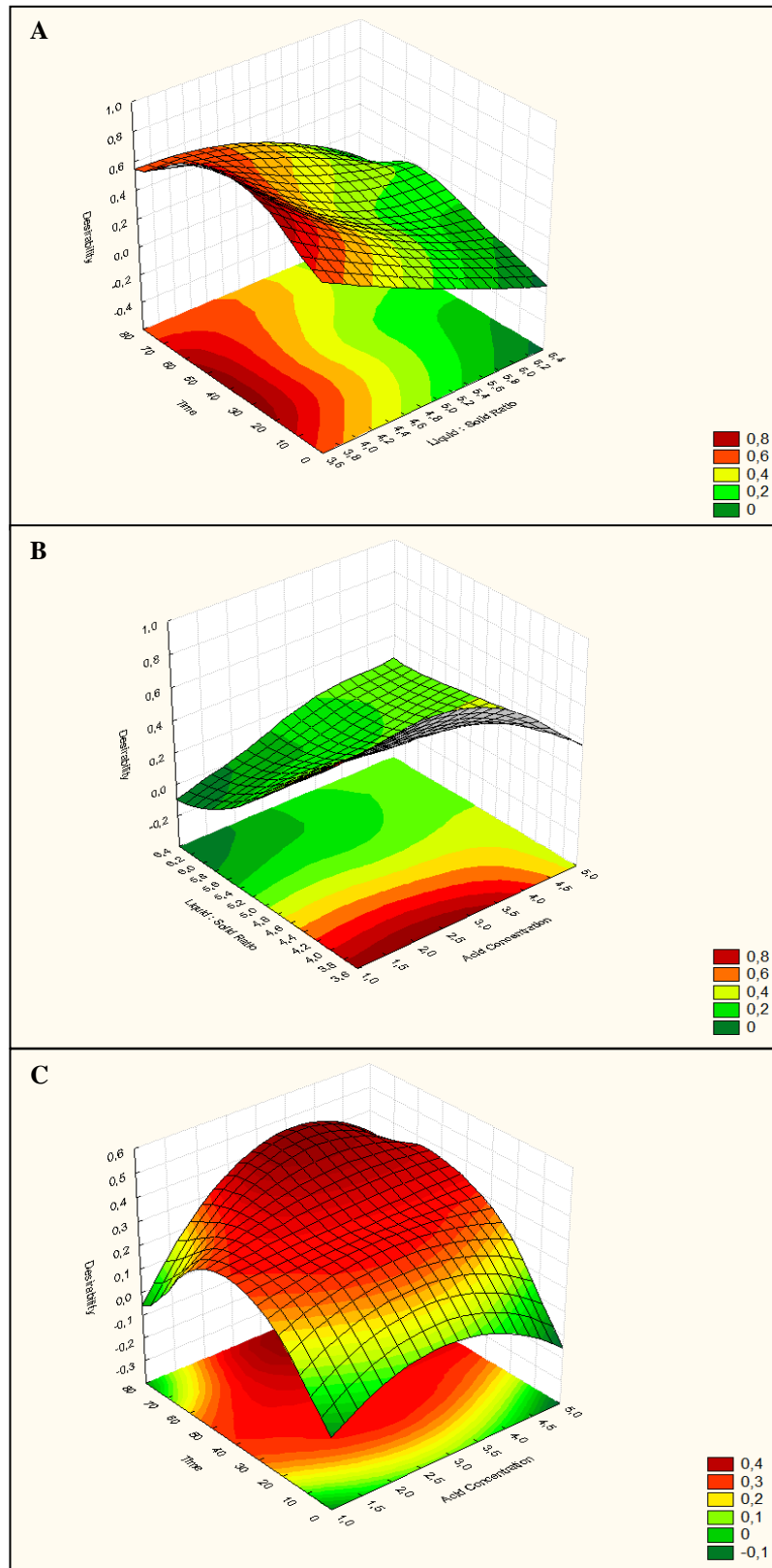


Figura 5: Gráficos de superfície de resposta para a função *desirability* do tratamento de hidrólise ácida para obtenção de ART (g/L) e D-xilose (g/L) segundo a relação entre (A) tempo vs proporção líquido : sólido, (B) proporção líquido : sólido vs concentração de ácido sulfúrico e (C) tempo vs concentração de ácido sulfúrico.

Os gráficos de superfície de resposta para a função *desirability* (figura 5) indicam que as maiores concentrações, quer de ART, quer de D-xilose, foram obtidas quando utilizadas os menores níveis do fator “proporção líquido : sólido”, e os parâmetros referentes aos pontos centrais dos fatores “tempo” e “concentração de ácido”.

As concentrações de D-xilose ora obtidas são similares e, em alguns ensaios, superiores aos valores obtidos por Hernandez-Salas et al. (2009), quando hidrolisando bagaço de cana-de-açúcar com ácido clorídrico (1,2% v/v).

Comparadas aos valores obtidos por Betancur (2010), as concentrações de D-xilose obtidas neste ensaio são consideravelmente menores, fato que pode estar relacionado aos graus de severidade empregados. Segundo Vargas Betancur e Pereira Junior (2010), graus de severidade em torno de 1,8 associados a maiores volumes de ácido podem conduzir a redução nas concentrações finais de D-xilose e, por conseguinte, na eficiência da hidrólise.

Segundo Vargas Betancur e Pereira Júnior (2010), elevadas concentrações de ácido podem levar a obtenção de hidrolisado hemicelulósico rico em inibidores do crescimento microbiano, constituindo meio hostil aos micro-organismos fermentadores. É provável, portanto, que tenha havido perda na proporção de D-xilose obtida em função das concentrações de ácido utilizadas neste delineamento. Estes autores indicam que o protocolo ideal para hidrólise ácida com ácido sulfúrico à concentração de 1,09%, 27 minutos de tratamento térmico e 2,8 mL de líquido para cada 1 grama de bagaço.

Betancur (2010) obteve razão sólido : líquido como a variável mais significativa para obtenção de maior concentração de D-xilose oriunda da hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. O mesmo autor encontrou que elevadas concentrações de ácido sulfúrico conduzem a obtenção de maiores concentrações de furfural e hidroxi-metilfurfural, inibidores do crescimento microbiano formados pela oxidação de pentoses e hexoses, respectivamente.

Segundo Jaramillo et al. (2013), o rendimento de D-xilose em processos de hidrólise ácida tem relação diretamente proporcional à razão sólido : líquido, isto é, menores proporções de volumes empregadas conduzem a obtenção de maiores concentrações de D-xilose. O resultado obtido reforça tal hipótese, tendo havido, a despeito disso, eficiência do pré-tratamento ora empregado em acessar a fração hemicelulose da biomassa.

Aplicando-se a ferramenta de perfis de predição de otimização e valores desejáveis, os valores estimados pelo software Statistica 6.0 ®, para ambas as variáveis de resposta, foram: 5,0 mL de ácido sulfúrico (3%) por grama de bagaço, com tratamento térmico de 40 minutos. Este resultado está em consonância com o estabelecido por Fogel et al. (2005), os quais afirmam que concentrações de ácido superiores a 3% são desnecessárias e não aumentam a eficiência da hidrólise.

Tendo em vista a provável formação de grandes quantidades de inibidores do crescimento microbiano, o hidrolisado hemicelulósico obtido neste trabalho constitui-se um meio de alta seletividade, ideal para selecionar leveduras com elevada tolerância a estes inibidores e potenciais produtoras de xilitol. As concentrações dos referidos inibidores serão quantificadas em etapas posteriores desta tese.

1.4 Conclusões

A proporção líquido : sólido foi o fator com maior efeito significativo na obtenção de açúcares redutores totais e D-xilose, havendo diminuição na concentração de D-xilose quando se emprega maiores volumes de ácido. A predição de otimização indicou que os valores ótimos, para ambas as variáveis de resposta, correspondem aos do ponto central, condições que serão utilizadas para as etapas subsequentes deste trabalho.

Estima-se que o hidrolisado hemicelulósico obtido neste trabalho presta-se a seleção de espécies com alta tolerância aos inibidores do crescimento microbiano e potenciais produtoras de xilitol.

A comparação dos dados ora obtidos com as referências bibliográficas, sugerem que a utilização de ácido sulfúrico em concentrações menores, bem como o emprego de menores volumes deste, poderia levar a obtenção de maiores concentrações de D-xilose, aumentando a eficiência do processo de hidrólise e diminuindo o dispêndio deste reagente.

1.5 Referências Bibliográficas

BETANCUR, G. J. V. (2010). *Otimização do Pré-Tratamento Ácido de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico para a Produção*

- de Etanol de Segunda Geração*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 174 pp.
- BRASIL. (2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Sistema IBGE de Recuperação Automática*. Brasília: SIDRA. Available at <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Accessed: 27/10/2014.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. (2009). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-009-8792-8.
- CASSA-BARBOSA, L. A. (2012). *Isolamento e Caracterização de Leveduras Fermentadoras de Pentoses da Biodiversidade Amazônica*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 74 pp.
- CUNHA, A. F.; MISSAWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F. e PEREIRA, G. A. G. (2006). Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Res.* 6: 280–287. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00038.x
- FOGEL, R.; GARCIA, R. R.; OLIVEIRA, R. S.; PALACIO, D. N. M.; MADEIRA, L. S.; PEREIRA JR., N. (2005). Optimization of Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse and Investigations on its Fermentability for the Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121–124: 741 – 752.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*. 100: 1238–1245. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S. S.; SARROUH, B. F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J.; QIU, X. (2009). Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 152: 199–212. DOI: 10.1007/s12010-008-8249-5
- JARAMILLO, O. J.; GÓMEZ-GARCÍA, M. A.; FONTALVO, J. (2013). Prediction of acid hydrolysis of lignocellulosic materials in batch and plug flow reactors. *Bioresource Technology* 142: 570–578. DOI 10.1016/j.biortech.2013.05.064

- MATOS, I. T. S. R. (2010). *Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 68 pp.
- MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; COSTA NETO, P. Q.; ASTOLFI FILHO, S. (2012). Cultivation of *Trichosporon mycotoxinivorans* in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate. *Electronic Journal of Biotechnology*. 15 (1).
- MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; MEDEIROS-GALVÃO, R. S.; NUNES-SILVA, C. G.; ASTOLFI-FILHO, S. (2014). 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*. 30 (1): 260-266.
- SAHA, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 279–291.
- SCHELL, D. J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; McMILLAN, J. D. (2003). Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 105 (1-3): 69-85.
- STATSOFT, Inc. (2002). STATISTICA (data analysis software system), version 6.0. Available from Internet: www.statsoft.com. Statsoft, Inc.
- VARGAS BETANCUR, G. J.; PEREIRA JUNIOR, N. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (3). DOI: 10.2225/vol13-issue3-fulltext-3
- WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K. e WALKER, G. M. (2008). Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Research*. 8: 1175–1184. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x

CAPÍTULO 2: Isolamento e Identificação de Leveduras Hábeis em Metabolizar Hidrolisado Hemicelulósico e Fermentar D-xilose Associadas a Besouros Xilófagos

2.1 Introdução

Leveduras são micro-organismos integrantes do reino *Fungi*, distribuídos entre os filos Ascomycota, Basidiomycota e no filo-forma Deuteromycota (ALEXOPOULOS et al., 1996). Caracterizam-se por serem predominantemente unicelulares, realizando reprodução assexuada por brotamento ou fissão binária. Pode ocorrer dimorfismo em algumas espécies, isto é, alguns fungos filamentosos podem crescer com forma semelhante a leveduras, principalmente quando submetidos à escassez de O₂ e abundância de CO₂, os quais são referidos como leveduróides (em inglês, *yeast-like*).

Apresentam hábito cosmopolita, sendo capazes de colonizar os mais diversos habitats, crescendo em condição comensal, mutualista, parasita ou inquilina de outros organismos como plantas e animais. Várias espécies apresentam aplicações industriais, sendo a maioria destas pertencentes ao subfilo Saccharomycotina (STAJICH et al., 2009).

Entre as aplicações biotecnológicas de leveduras, a fermentação alcoólica é a mais disseminada, sendo empregada pela humanidade desde os tempos mais remotos, na panificação e produção de cerveja (DEMAIN e SOLOMON, 1981). Estes processos baseiam-se na utilização de hexoses pela via glicolítica para a produção de etanol e dióxido de carbono. Embora haja um número relativamente alto de espécies hábeis em efetuar a fermentação de hexoses, um número restrito de espécies conhecidas é capaz de fermentar pentoses, abundantes principalmente na fração hemicelulose da biomassa lignocelulósica (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Diante deste fato, a busca por novas espécies/linhagens microbianas selvagens dotadas desta habilidade é um importante passo.

Besouros são animais da ordem Coleoptera (Insecta, Artropoda, Metazoa), sendo esta a ordem mais diversa dentro da classe Insecta, composta por pelo menos 400.000 espécies atualmente descritas (LELEJ e STOROZHENKO, 2010). A associação simbiote entre besouros e micro-organismos foi decisiva na evolução destes, sendo-lhes indispensável para

manutenção da vida. Estes invertebrados contam com os micro-organismos para várias funções metabólicas, incluindo síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídios, esteróides, ferormônios, degradação de polímeros nutricionais e detoxificação de compostos inibidores (SUH et al., 2003).

Dentro da ordem Coleoptera, a família Passalidae caracteriza-se por apresentar hábitos de herbivoria e xilofagia ao longo de todas as fases do ciclo de vida. Segundo Suh et al. (2003), esta família habita troncos que servem de substrato para diversas espécies de fungos, os quais fazem associações simbióticas com estes besouros. Os passalídeos formam colônias sub-sociais nas quais os adultos processam a madeira para alimentação das larvas, que adquirem a microbiota presente nos fragmentos de madeira providos pelos adultos (MARINONI et al., 2001).

Breznak (1982) afirmou que o estudo da microbiota associada a insetos xilófagos forneceria novas ferramentas na bioconversão anaeróbia de biomassa lignocelulósica a combustíveis e outros produtos químicos com valor agregado. Mais recentemente, Blackwell et al. (2004) mencionaram que a associação entre besouros xilófagos e leveduras fermentadoras de D-xilose implica em benefício aos besouros no que diz respeito ao sucesso na assimilação dos nutrientes presentes na biomassa lignocelulósica. Segundo Suh et al. (2005a), o intestino de besouros xilófagos é uma fonte hiperdiversa em espécies de leveduras ainda não descritas.

Poucos trabalhos tratam da diversidade de leveduras hábeis em fermentar D-xilose, metabolizar lignocelulose e seus derivados associadas ao intestino de besouros xilófagos, dos quais nenhum trata de espécies coletadas em habitats amazônicos. Diante deste contexto, o objetivo deste capítulo foi isolar e identificar leveduras associadas a besouros xilófagos coletados na Amazônia Central, avaliando sua capacidade em produzir etanol e/ou xilitol a partir de D-xilose.

2.2 Material e Métodos

Os besouros foram coletados a partir de troncos em decomposição em área de floresta de terra firme, no campus da Universidade Federal do Amazonas (3°06'05.20" S,

59°58'23.14"W), sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (documento nº: 34652-1).

Os mesmos foram identificados pela Profa. Dra. Nair Otaviano Aguiar como membros da espécie *Veturius transversus* (Passalidae, Coleoptera, Insecta, Artropoda, Metazoa), e três exemplares foram depositados na Coleção Entomológica Paulo Burnheimn (Departamento de Biologia / Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Amazonas).

Os élitros foram separados e o abdome foi seccionado, expondo o trato digestório, o qual foi dissecado e fragmentado para inoculação em meio seletivo (figura 6).

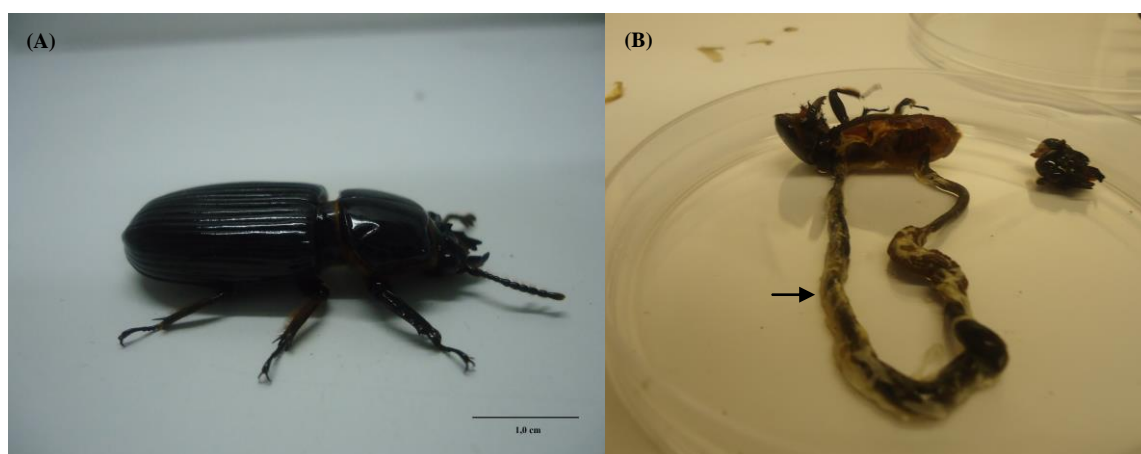


Figura 6: Exemplar de *Veturius transversus* em seu estado intacto (A) e posterior a dissecção do tubo digestório (→) (B).

O meio seletivo (MS) foi composto de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, obtido conforme descrito no capítulo 1, diluído à concentração de açúcar redutor total de 10 g/L, suplementado com *Yeast Nitrogen Base without aminoacids* (YNB), à concentração de 6,7 g/L.

Tubos de ensaio contendo 10 mL de MS e fragmentos do intestino de *V. transversus* foram incubados a 30 °C e 120 rpm por 48 horas. A seguir, alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo MS acrescido de Ágar (20 g/L), incubadas a 30 °C até o crescimento das colônias. As leveduras foram isoladas em placas contendo Ágar Sabouraud (peptona 10 g/L; glicose 40 g/L; Ágar 20 g/L) e preservadas em água destilada esterilizada.

Para identificação taxonômica, os isolados foram caracterizados por meio de provas bioquímicas utilizando o kit ID32C (Biomerieux®). Cada levedura foi semeada em Ágar Sabouraud por até 48 horas a 28 °C. A seguir, fragmentos de colônias foram suspensos em

água destilada esterilizada à turbidez correspondente a nível 2 na escala MacFarland (Absorbância = $0,100 \pm 0,005$, $\lambda = 600$ nm, conforme curva padrão na figura 7). Foram transferidos 250 μ L desta suspensão para o meio API C, fornecido pelo fabricante. Em seguida, 135 μ L desta última foram semeados em cada poço da galeria contendo a fonte de carbono ou nitrogênio. As culturas foram incubadas a 28 °C por até 48 horas. O perfil bioquímico de cada isolado foi plotado no aplicativo on-line ApiWeb (<http://apiweb.biomerieux.com/>), a partir do qual se verificou a identidade dos isolados com cepas de referência conforme o banco de dados da Biomerieux ®.

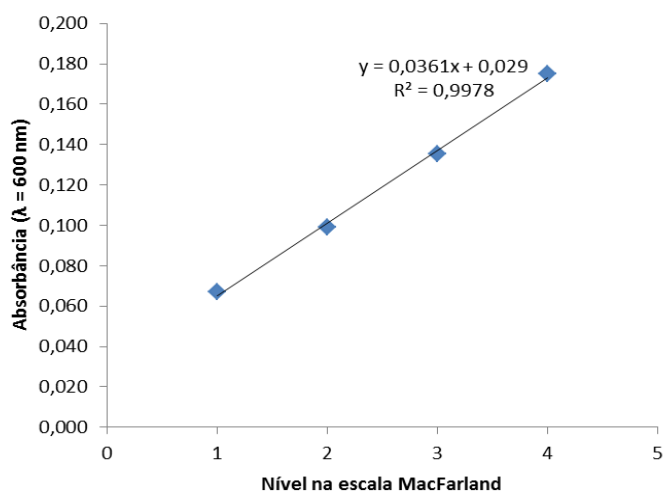


Figura 7: Curva padrão de absorbância entre os níveis 1 e 4 da escala MacFarland.

Os isolados foram caracterizados também pela sequência de nucleotídeos da região ITS (Internal Transcribed Spacer) e de genes de rRNA. Uma alçada de cada colônia foi cultivada em meio YPD (extrato de leveduras 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 20 g/L) por 48 horas a 30 °C e 120 rpm. Para extração do DNA genômico, 2 mL de cada cultivo foi centrifugado (12000 rpm, 5 minutos), descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 200 μ L de tampão H (Triton X-100, 20 mL/L; SDS 10 mL/L; NaCl, 100 mM; Tris-HCl pH 8.0, 10 mM; EDTA, 1 mM). As amostras foram incubadas em gelo por 2 minutos e a 95 °C por 1 minuto, se repetindo estes passos duas vezes.

A seguir, as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 30 segundos, se adicionando 200 μ L de clorofórmio e novamente agitando-as em vórtex por dois minutos. Procedeu-se nova centrifugação (12000 rpm, 3 minutos), se descartando o sobrenadante e adicionando 400 μ L de etanol absoluto gelado, se misturando por inversão e incubando a -20 °C por 5 minutos. Efetuou-se nova centrifugação (12000 rpm, 5 minutos), descartando-se o

sobrenadante e adicionando-se 500 µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas, descartando-se o sobrenadante e deixando o *pellet* secar a temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar. O DNA foi suspenso em TE (Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM), mantido a 4 °C por até 24 horas e posteriormente preservado a -20 °C (HARJU et al., 2004).

O DNA genômico foi amplificado utilizando os primer's ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). As reações de amplificação foram executadas em volumes finais de 25µL compostas de MgCl₂ 50 mM (1,25 µL), tampão 10x (2,5 µL), DNTP's (2,5 µL), primer's (1,0 µL de cada), Taq Polimerase (0,3 µL), DNA (~25 ng) e água ultrapura filtrada (q.s.p.). O termociclo utilizado foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos com desnaturação a 94 °C (40 s), anelamento dos primer's a 58 °C (1 min) e alongação a 72 °C (2 min). A seguir, a etapa de alongação final a 72 °C por 2 minutos e interrupção da reação mantendo o sistema a 4 °C e posterior preservação por congelamento.

Os produtos de PCR foram utilizados para reação de sequenciamento por terminação de cadeia, seguindo o protocolo do kit BigDye® (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas em sequenciador Applied Biosystems 3130. As sequências obtidas foram submetidas a teste de qualidade utilizando a ferramenta PHPH (TOGAWA e BRIGIDO, 2003; disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e, quando com qualidade adequada, submetidas a alinhamento com as sequências do *GenBank* utilizando o aplicativo BLAST (sigla em inglês para Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para analisar as relações filogenéticas entre os isolados, as sequências obtidas foram alinhadas usando a ferramenta Clustal W, e analisadas usando algoritmo de reconstrução filogenética de agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining), segundo o método Bootstrap (2000 réplicas) provido pelo software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As sequências nucleotídicas da região ITS de *Meyerozyma guilliermondii* (*GenBank* JN974905), *Trichosporon mycotoxinivorans* (*GenBank* JX891097) e *Scheffersomyces stipitidis* (*GenBank* GU 256745) foram incluídas na árvore para constituírem grupos de referência, sendo esta última usada como grupo externo para composição da árvore filogenética.

Os testes de fermentação e consumo de D-xilose foram executados cultivando as leveduras em meio líquido composto de D-xilose (50 g/L) e YNB (6,7 g/L), a 30 °C e 120 rpm por 7 dias. Decorrido este prazo, uma alíquota de cada ensaio foi centrifugada (12000 rpm, 15 minutos) e filtrada em membrana de nitrocelulose (0,22 µm), sendo analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna Rezex RPM Monossacarídeos (300 x 7,8 mm; Pb²⁺ 8%, Phenomenex) para quantificação de xilose, etanol e xilitol.

2.3 Resultados e Discussão

Um total de 20 colônias de leveduras foram isoladas de *V. transversus*, as quais foram inicialmente identificadas por código numérico sequencial. Baseado em perfis bioquímicos, as mesmas foram identificadas como exemplares de 11 espécies distintas, distribuídas em 4 gêneros. Os perfis bioquímicos completos, com identificação em nível de espécie e identidade entre os isolados e cepas de referência se encontram expostos na tabela 5.

Todos os isolados apresentaram capacidade de assimilar D-xilose e pelo menos 50% demonstrou habilidade em assimilar arabinose, ambas pentoses abundantes na fração hemicelulose da biomassa. Este resultado indica intrínseca associação entre *V. transversus* e diferentes espécies de leveduras hábeis em metabolizar hemicelulose, fato decisivo no sucesso evolutivo destes enquanto xilófagos.

Os perfis bioquímicos correspondentes ao gênero *Candida* foram os mais frequentes entre os isolados, representando 55% destes. Este fato se deve ao grande número de espécies cuja fase assexuada (anamorfo) é identificada dentro do gênero *Candida*, que constitui um grupo polifilético (SCHAUER e HANSCHKE, 1999; SUH et al., 2005b).

As espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são patogênicas oportunistas de humanos, acometendo principalmente pacientes imunodeprimidos. Ambas apresentam notável habilidade em assimilar e fermentar sacarose, sendo *C. tropicalis* hábil em fermentar maltose; são potenciais secretoras de enzimas hidrolíticas como proteases e fosfolipases (SILVA et al., 2012), fato que pode conferir vantagem ao besouro quando associado a estas.

Tabela 5: Perfis bioquímicos dos isolados de *V. transversus*, identificados segundo *ApiWeb* (Biomerieux®).

Isolado	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TER	2KG	MDG	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	MAN	LAC	INO	GLU	SBE	GLN	ESC	Espécie	Identidade (%)	
01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	<i>Cryptococcus humicola</i>	98,4%	
02	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>Cryptococcus curvatus</i>	-	
03	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	79,1%	
04	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>Candida membranifaciens</i>	-	
05	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>Candida intermedia</i>	-	
06	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Candida parapsilosis</i>	-	
07	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cryptococcus humicola</i>	99,2%	
08	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Cryptococcus humicola</i>	99,7%
09	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	<i>Candida tropicalis</i>	53,6%
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cryptococcus humicola</i>	99,5%	
11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Candida famata</i>	-	
12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Geotrichum capitatum</i>	97,7%	
13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Geotrichum capitatum</i>	97,7%	
14	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Candida sake</i>	99,5%	
15	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Candida sake</i>	99,0%	
16	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Candida parapsilosis</i>	83,1%	
17	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>Candida tropicalis</i>	-	
18	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Candida sake</i>	95,4%	
19	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>Candida tropicalis</i>	94,4%	
20	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Candida intermedia</i>	95,7%	

Legenda: GAL – galactose, ACT – Ciclo-heximida, SAC - Sacarose, NAG – N-Acetil glicosamina, LAT – Ácido láctico, ARA - Arabinose, CEL - Celobiose, RAF – Rafinose, MAL - Maltose, TRE - Trealose, 2KG – 2-Ceto-gluconato, MDG – α-Metil-glicopiranosídeo, SOR - Sorbitol, XYL - Xilose, RIB - Ribose, GLY - Glicerol, RHA - Ramnose, PLE - Palatinose, ERY - Eritritol, MEL - Melibiose, GRT – Glucuronato de sódio, MLZ - Melezitose, GNT – Gluconato de potássio, LVT – Ácido Levulínico, MAN - Manitol, LAC - Lactose, INO - Inositol, GLU - Glicose, SBE - Sorbose, GLN - Glicosamina, ESC – Esculina citrato de ferro.

Candida intermedia é citada na literatura como fermentador de D-xilose, produzindo etanol a partir deste substrato com rendimento de até 90,6 % em condições ótimas (JYOTHI et al, 2005). Além disso, esta espécie apresenta habilidade em assimilar D-xilose em condições ácidas, efetuando co-transporte de D-xilose e H⁺; sendo o gene deste co-transportador (D-xilose – H⁺) atualmente utilizado na construção de organismos recombinantes por engenharia genética (LEANDRO et al., 2006). Pavana Jyothi et al. (2006) identificaram a habilidade em produzir xilitol por linhagens de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. intermedia*, sendo esta última hábil em produzir tanto xilitol quanto etanol.

Candida sake é uma espécie de levedura amplamente reportada como eficiente agente do controle biológico de fungos fitopatógenos (CALVO-GARRIDO et al., 2013), além de ser referida como importante patógeno oportunista em pacientes imunodeprimidos (HOEGL et al., 1998).

Candida membranifaciens é uma espécie a qual já foi isolada de diversos habitats, incluindo água do mar, ambientes lacustres e em associação a plantas. Suh et al. (2005b) isolaram e identificaram pelo menos 9 novas espécies intimamente relacionadas a *C. membranifaciens*, das quais pelo menos uma em associação a *Veturius platyrhinus*, besouro pertencente ao mesmo gênero dos coletados neste trabalho.

Candida famata (sinonímia *Debaryomyces hansenii* e *Torulopsis candida*) é descrita como típica levedura flavinogênica, sendo hábil em produzir riboflavina, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (DMYTRUK e SIBIMY, 2012).

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são descritas comumente como causadoras de doenças em pacientes imunodeprimidos (HUFFNAGLE e NOVERR, 2013), embora 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).

O gênero *Debaryomyces* é amplamente conhecido por seu potencial biotecnológico na acumulação de lipídeos em sua biomassa, podendo ser utilizado na produção de biodiesel. Além disso, algumas espécies dentro deste gênero são hábeis em produzir xilitol a partir de xilose (JOHNSON, 2013). Segundo Barnett et al. (1990), este gênero pode apresentar

sinonímias com *Pichia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e ainda anamorfos denominados no gênero *Candida*.

O gênero *Geotrichum* é constituído por fungos dimórficos, e corresponde aos anamorfos dos gêneros *Dipodascus* e *Galactomyces*. Gams et al. (2004) descrevem a ocorrência de *G. armillariae* como decompositor de corpos frutíferos de outras espécies de fungos. Benjamin et al. (2004) descrevem o teleomorfo *Dipodascus* como frequentemente associado a galerias de insetos em madeira em decomposição. A primeira descrição de ocorrência de *Geotrichum sp.* associada a intestino de besouros foi feita por Batra (1967).

Recentemente, Pimenta et al. (2005) descreveram a ocorrência de *Geotrichum silvicola* associada a *Drosophilla*. Aparentemente não existe uma especificidade entre este gênero e um hospedeiro em particular, já que as mesmas espécies podem ocorrer em associação a insetos filogeneticamente distantes (SUH e BLACKWELL, 2006). A ocorrência de *Geotrichum sp.* associada a *V. transversus* pode ser, portanto, mais associada ao habitat do que a uma interação simbiótica entre estes.

Tendo em vista que a utilização de fontes de carbono e nitrogênio por leveduras pode ser variável, ocorrendo variações de assimilação de uma determinada fonte de carbono mesmo entre linhagens distintas de uma mesma espécie, a identificação ora apresentada não é, por si só, conclusiva. Pode haver, portanto, equívocos de classificação, o que torna recomendável a confirmação da identidade destas por ferramentas de biologia molecular (BARNETT, 2004).

O alinhamento das sequências com a base de dados do *GenBank* indicou um total de três gêneros, sendo *Geotrichum* o mais representativo, com 11 espécimes. As sequências foram depositadas na base de dados do GenBank (NCBI), e os resultados do alinhamento das sequências usando o BLAST, bem como o número de acesso destas no banco de dados, são apresentados na tabela 6.

O gênero *Galactomyces* corresponde a uma sinonímia de *Geotrichum* (HOOG e SMITH, 2011) sendo provavelmente os isolados ora identificados integrantes de um grupo comum. As sequências obtidas a partir dos isolados identificados nestes gêneros apresentam similaridade com um isolado do solo na região de Manchester (Reino Unido) hábil em degradar polivinil-álcool (MOLLASALEHI, 2013; *GenBank* JX847775.1); com isolados da água de um lago alcalino em Yunnan (China) (LI et al., dados não publicados, *GenBank* JQ291803.1), e com linhagens isoladas por Rojas-Jimenez et al. (dados não publicados

GenBank HM771009.1 e GU827487.1) a partir de formas larvais e adultas de besouros xilófagos.

Estes mesmos isolados apresentam identidade relativamente alta com outros isolados obtidos de biofilmes em matéria orgânica (Matos et al., 2013, dados não publicados, KF512547.1), microbiota do solo de Michigan-USA (Lennon, 2012, dados não publicados, JQ437608.1), microbiota endofítica de plantas tropicais (Goldstein, 2010, dados não publicados, HM999937.1) e associadas a troncos de *Fraxinus excelsior* em decomposição no norte da Lituânia (Lygis et al., 2005). Conjuntamente, estes dados explicitam haver pouca resolução quanto a condição taxonômica do grupo, mas reforçam a condição cosmopolita deste gênero.

Tabela 6: Identificação taxonômica dos isolados baseada em máxima identidade a partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos.

Isolado	Espécie	Máxima identidade (%)	Cobertura (%)	e-Value	Número de acesso <i>GenBank</i>
01	<i>Geotrichum sp.</i>	93	92	1e-119	KP276644
02	<i>Geotrichum sp.</i>	95	93	3e-131	KP276636
03	<i>Candida tropicalis</i>	99	98	0.0	KP276645
04	<i>Geotrichum sp.</i>	94	100	1e-121	KP276637
05	<i>Galactomyces candidum</i>	96	97	1e-131	KP276638
06	<i>Geotrichum sp.</i>	96	99	1e-126	KP276639
07	<i>Williopsis saturnus</i>	99	100	0.0	KP257575
08	<i>Candida tropicalis</i>	98	99	0.0	KP276646
09	<i>Candida tropicalis</i>	99	99	0.0	KP276647
10	<i>Candida tropicalis</i>	98	99	0.0	KP276648
11	<i>Candida tropicalis</i>	98	99	0.0	KP276649
12	<i>Galactomyces candidum</i>	96	98	1e-136	KP276640
13	<i>Galactomyces geotrichum</i>	96	98	1e-136	KP276641
14	<i>Geotrichum sp.</i>	95	100	1e-125	KP276642
15	<i>Geotrichum sp.</i>	94	100	3e-102	KP288488
16	<i>Williopsis saturnus</i>	99	100	0.0	KP257574
17	<i>Geotrichum sp.</i>	93	99	7e-129	KP288487
18	<i>Williopsis saturnus</i>	99	100	0.0	KP257573
19	<i>Geotrichum sp.</i>	94	99	5e-134	KP276643
20	<i>Candida tropicalis</i>	97	99	0.0	KP276650

Os isolados 07, 16 e 18 integram o gênero *Williopsis*, todos com identidade de 99% com *W. saturnus* e *e-value* 0.0, indicando probabilidade nula de haver alinhamento em maior nível de identidade. A base dados taxonômicos do NCBI indica a sinonímia *Cyberlindnera* para o referido táxon. Kurtzman (2011) sugere, baseado em estudos filogenéticos, que a espécie *W. saturnus* seja reposicionada em um novo gênero, denominado *Lindnera*. Admitidas tais

hipóteses, os referidos isolados podem ser identificados como *Williopsis saturnus* ou pelas sinónimas *Cyberlindnera saturnus* e *Lindnera saturnus*. Esta espécie é reportada na literatura recente como produtor de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (KAMAT et al., 2013a) e de espiga de milho (KAMAT et al., 2013b).

Seis isolados foram identificados como *Candida tropicalis*, apresentando similaridade entre 97 e 99%, com probabilidade nula de alinhamento mais fidedigno. Para o isolado VT09, o alinhamento da sequência obtida corrobora com o resultado do perfil bioquímico. Dados não publicados, obtidos a partir do *GenBank*, indicam similaridade com isolados da microbiota oral de populações chinesas (Gong e Zengh, 2011; JN606259.1), a isolados selvagens capazes de degradar anilina (Wang et al., 2010; HM231275.1) e a leveduras selvagens produtoras de xilanases, isoladas a partir de canaviais do Brasil (Lara et al., 2013; KF113448.1). Considerando a já mencionada condição polifilética do gênero *Candida*, um estudo filogenético e taxonômico mais profundo seria necessário para elucidar a classificação dos isolados ora apresentados.

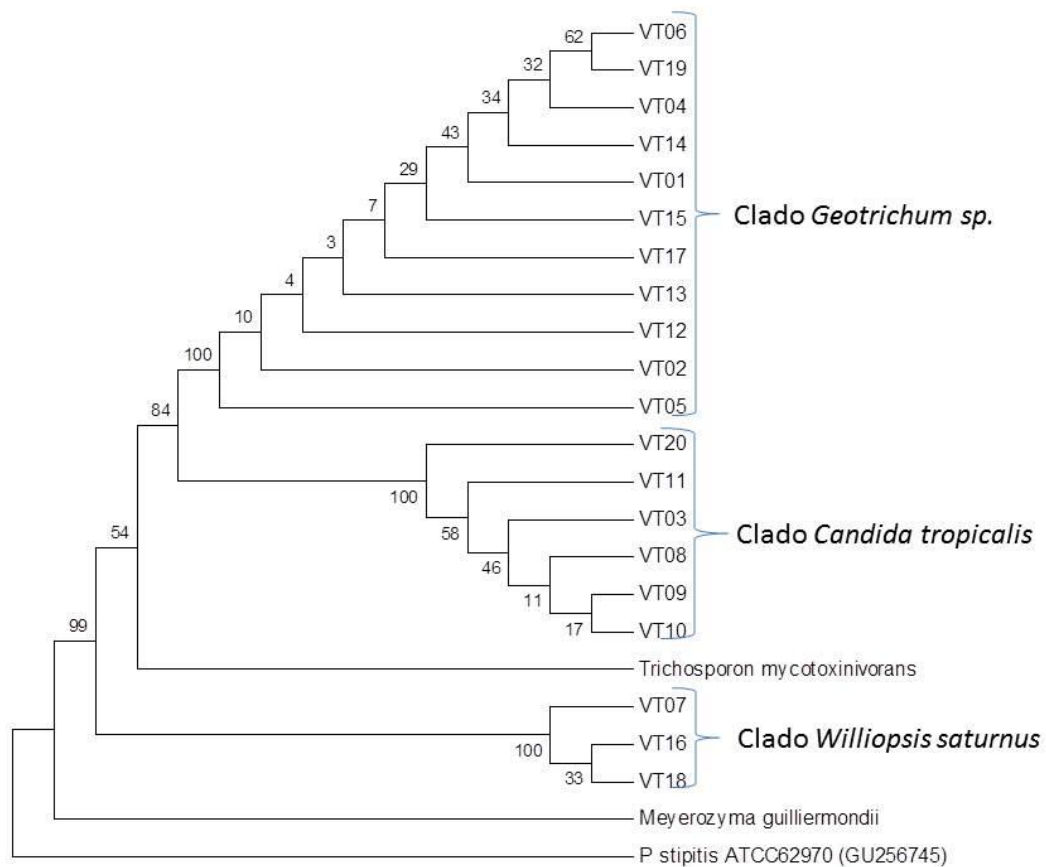


Figura 8: Árvore Filogenética indicando o agrupamento dos isolados em três clados distintos.

A análise filogenética indicou que os isolados constituem três clados, ora denominados clado *Geotrichum sp.*, com 11 espécimes, clado *Candida tropicalis*, com 6 espécimes, e o clado *Williopsis saturnus*, com três espécimes. A árvore obtida (figura 8) sugere que o clado *Candida tropicalis* se agrupa mais proximamente com o clado *Geotrichum sp.* e com *T. mycotoxinivorans*; ao passo que *M. guilliermondii*, *S. stipitis* e o clado *Williopsis saturnus* se destacam das demais sequências analisadas como grupos distintos.

Considerando que estudos taxonômicos recentes baseados em filogenética indicam o reposicionamento de diversos grupos, se faz necessário expandir a análise dos referidos isolados, incluindo a verificação de sequências de outros genes conservados, além de caracteres morfológicos, a fim de elucidar a classificação taxonômica destes isolados em nível de espécie.

O teste de fermentação de D-xilose indicou que nenhuma das linhagens isoladas foi capaz de produzir etanol. Quanto à produção de xilitol, somente os isolados 12 e 13 (ambos *Geotrichum capitatum*) não apresentaram tal capacidade. Os valores referentes a consumo de xilose (%) e rendimento de xilitol (%) são apresentados na tabela 7 (cromatogramas correspondentes apresentados no anexo II).

Tabela 7: Consumo de D-xilose e Rendimento percentual de xilitol por cada isolado.

Isolado	Consumo de D-xilose (%)	Rendimento de xilitol (%)
01	92,6	50,2
02	29,9	21,0
03	33,4	21,4
04	36,2	25,5
05	30,7	18,6
06	35,6	22,4
07	31,0	16,9
08	33,2	18,0
09	34,0	17,0
10	30,7	10,0
11	100,0	33,9
12	27,5	0,0
13	18,7	0,0
14	100,0	31,5
15	100,0	32,6
16	100,0	30,4
17	41,4	30,4
18	100,0	34,1
19	100,0	37,0
20	100,0	34,7

A produtividade máxima teórica de xilitol, baseada em estequiometria, é 100%, isto é, 1,0 g de xilitol produzido para cada 1,0 g de xilose consumida. Apesar disso, o rendimento máximo teórico não é alcançado por nenhuma espécie conhecida, tendo em vista que este poliol é um soluto compatível, produzido em resposta a condições de estresse osmótico, sendo consumido posteriormente pela via das pentoses-fosfato. Segundo Aranda-Barradas et al. (2010), as espécies produtoras de xilitol apresentam rendimentos entre 40 e 70%. A maior produtividade conhecida em processos fermentativos foi observada em *Candida sp.*, com 85% de rendimento (GRANSTRÖM et al., 2007).

Neste trabalho, a maior produtividade foi obtida por *Geotrichum sp.* VT01, com rendimento de 0,502 g/g (50,2%). Estes valores se encontram em consonância com a faixa estabelecida por Aranda-Barradas et al. (2010). Este é o primeiro trabalho a reportar a produção de xilitol por linhagens selvagens de *Geotrichum* isolados da Amazônia. Face a estes resultados, *Geotrichum sp.* VT01 foi selecionado para etapas posteriores do trabalho, a fim de se caracterizar a produção de xilitol por esta linhagem em hidrolisado hemicelulósico.

2.4 Conclusões

As leveduras hábeis em metabolizar hidrolisado hemicelulósico isoladas a partir do intestino de *Veturius transversus* apresentam 11 perfis bioquímicos distintos, fisiologicamente similares a 11 espécies de 4 gêneros. A análise filogenética indica que os mesmos se encontram distribuídos em três clados, à saber, *Geotrichum sp.*, *Candida tropicalis* e *Williopsis saturnus*.

Os gêneros *Geotrichum* e *Candida* foram os mais representativos, provavelmente por se tratarem de grupos polifiléticos, com situação taxonômica pouco resolvida, cuja fase sexuada não fora identificada e havendo, portanto, grande número de anamorfos classificados dentro destes.

A microbiota ora isolada é composta por leveduras descritas na literatura como hábeis em secretar enzimas hidrolíticas, vitaminas, realizar controle biológico e sintetizar ácidos graxos usando lignocelulose como fonte de carbono. Estas habilidades podem conferir vantagem aos besouros, o que explicaria a associação entre estes e as leveduras em questão.

Geotrichum sp. VT01 apresenta maior rendimento de xilitol, tendo sido selecionado para etapas posteriores do trabalho.

2.5 Referências Bibliográficas

- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology Biotechnology*. 90:1219–1227. DOI: 10.1007/s00253-011-3200-z
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4^a ed. John Wiley & Sons, New York.
- ARANDA-BARRADAS, J. S.; GARIBAY-ORIJEL, C.; BADILLO-CORONA, J. A.; SALGADO-MANJARREZ, E. (2010). A stoichiometric analysis of biological xylitol production. *Biochemical Engineering Journal*. 50: 1–9. DOI: 10.1016/j.bej.2009.10.023
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. (1990). *Yeasts: characteristics and identification*. 2^a ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- BARNETT, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*. 21: 1141 – 1193. DOI: 10.1002/yea.1154
- BATRA, L. R. (1967). Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia*. 59: 976–1017.
- BENJAMIN, R. K.; BLACKWELL, M.; CHAPELA, I. H.; HUMBER, R. A.; JONES, K. G.; KLEPZIG, K. D.; LICHTWARDT, R. W.; MALLOCH, D.; NODA, H.; ROEPER, R. A.; SPATAFORA, J. W.; WEIR, A. (2004). Insect- and other Arthropod-associated fungi. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, pp: 395-433.
- BLACKWELL, M.; SUH, S. O; WHITE, M. M.; NGUYEN, N H. (2004). The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. *Mycologia*. 96 (4): 756–760.
- BREZNAK, J. A. (1982). Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 323-343.
- CALVO-GARRIDO, C.; ELMER, P. A. G.; VIÑAS, I.; USALL, J.; BARTRA, E.; TEIXIDÓ, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast

antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*. 62: 510–519. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02684.x

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. (1981). Industrial microbiology: Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. *Scientific American*. 245 (3): 43–52.

DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. A. (2012). *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*. 29: 453–458. DOI: 10.1002/yea.2929

GAMS, W.; DIEDERICH, P.; PÖLDMAA, K. (2004). Fungicolous Fungi. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (Eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego. p. 343-393

GRANSTRÖM T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. (2007). A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 273–276

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74: 937–953. DOI 10.1007/s00253-006-0827-2

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol*. 21: 4-8.

HOEGL, L.; SCHÖNIAN, G.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. (1998). *Candida sake*: A relevant species in the context of HIV-associated oropharyngeal candidosis? *Journal of Molecular Medicine*. V. 76, n. 1: 70-73.

HOOG, G. S.; SMITH, M. T. (2011). *Galactomyces* RedHead & Malloch (1977). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts, a taxonomic study*. 5th. Edition. Vol. 2: 413 – 420. Elsevier, London, UK.

HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in Microbiology*. V. 21, n. 7. DOI: 10.1016/j.tim.2013.04.002

- JOHNSON, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts - the ascomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97:503–517. DOI 10.1007/s00253-012-4497-y
- JYOTHI, C. P., RAO, R. S.; RAJESHAM, S.; RAO, L. V. (2005). Ethanol production from D-xylose by *Candida intermedia* MTCC-1404: Parameter optimization using Taguchi's overall evaluation criteria technique. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 7 (4): 679-684.
- KAMAT, S.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. (2013a). Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. *Bioresource Technology* . (135): 246 – 253. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.059
- KAMAT, S.; GAIKWAD, S.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. (2013b). Xylitol production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*. (115): 1357 – 1367. DOI: 10.1111/jam.12327
- KURTZMAN, C. P. (2011). *Lindnera* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts, a taxonomic study*. 5th. Edition. Vol. 2: 521 – 544. Elsevier, London, UK.
- LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. 395: 543–549. DOI: 10.1042/BJ20051465
- LELEJ, A. S.; STOROZHENKO, S. Y. (2010). Insect Taxonomic Diversity in the Russian Far East. *Entomological Review*. 90 (2): 372–386. DOI: 10.1134/S001387381003005X
- LYGIS, V.; VASILIAUSKAS, R.; LARSSON, K.; STENILID, J. (2005). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 20 (4): 337-346.

- MARINONI, R. C.; GANHO, N. G.; MONNÉ, M. L.; MERMUDES, J. R. M. (2001). *Hábitos alimentares em Coleoptera (Insecta): compilação, organização de dados e novas informações sobre alimentação nas famílias de coleópteros*. Holos Editora. Ribeirão Preto.
- MOLLASALEHI, S. (2013). Fungal Biodegradation of Polyvinyl Alcohol in Soil and Compost Environments. Tese de Doutorado: Faculty of Life Sciences, The University of Manchester, United Kingdom. 156 pp. Disponível em <https://www.escholar.manchester.ac.uk/api/datastream?publicationPid=uk-ac-man-scw:203660&datastreamId=FULL-TEXT.PDF>
- PAVANA JYOTHI, C. H.; SREENIVAS RAO, R.; VENKATESWAR RAO, L. (2006). Isolation and screening of yeast for ethanol and xylitol production from D-xylose. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 8 (4): 785-789.
- PIMENTA, R. S.; ALVES, P. D. D.; CORRÊA JR, A.; LACHANCE, M. A.; PRASAD, G. S.; RAJARAM; SINHA, B. R. R. P.; ROSA, C. A. (2005). *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 497–501. DOI 10.1099/ijs.0.63187-0
- SCHAUER, F.; HANSCHKE, R. (1999). Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses*. 1: 12-21.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Review*. 36: 288 – 305. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y. SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*. 19 (18): 840-845.
- SUH, S. O.; BLACKWELL, M. (2006). Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum hysteridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. *Mycological Research*. 110 (1): 220–228. DOI: 10.1016/j.mycres.2005.08.008

- SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; McHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. (2003). Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*. 12: 3137–3145. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01973.x
- SUH, S. O.; McHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M. (2005a). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological Research*. 109 (3): 261–265. DOI: 10.1017/S0953756205002388
- SUH, S. O.; NGUYEN, N H.; BLACKWELL, M. (2005b). Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. *Mycological Research*. 109 (9): 1045–1056. DOI: 10.1017/S0953756205003254
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725 – 2729.
- TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology – IcoBiCoBi. 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto.

CAPÍTULO 3: Produção de Xilitol por *Geotrichum sp.* VT01 em Fermentação Submersa de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar.

3.1 Introdução

Xilitol é um açúcar-álcool (poliol) de cinco carbonos, produzido a partir da redução de D-xilose (figura 2). Sua obtenção pode ocorrer por síntese química ou por fermentação microbiana (MAYERHOFF et al., 1997). É comumente descrito como poderoso adoçante, com sabor doce idêntico ao da sacarose, mas sendo 40% menos calórico que este dissacarídeo (ARANDA-BARRADAS et al., 2010).

As aplicações médicas do xilitol estão relacionadas à redução da cárie dental (SAHA, 2003), redução da sensação de boca seca em pacientes acometidos de xerostomia (MEURMAN, 2012), efeito preventivo contra obesidade (PARAJÓ et al., 1998) e infecções do ouvido médio (AZARPAZHOOH et al., 2011). Seu potencial em induzir apoptose de algumas linhagens de células cancerosas tem sido investigado (GUO et al., 2013).

Atualmente a produção industrial de xilitol é efetuada pela de-hidrogenação química de D-xilose purificada, mas este processo é muito demorado e requer diversos passos para a remoção dos subprodutos (PARAJÓ et al., 1996). Neste contexto, a fermentação microbiana torna-se uma alternativa interessante para produção de xilitol com custos relativamente reduzidos.

A produção de xilitol por fermentação microbiana é efetuada principalmente se cultivando leveduras e/ou bactérias em hidrolisados hemicelulósicos, derivados de resíduos lignocelulósicos. Além de D-xilose e outros açúcares, os pré-tratamentos empregados na hidrólise da biomassa gera alguns inibidores do crescimento microbiano como furfural (2-furaldeído), hidroximetil-furfural, compostos fenólicos e ácido acético, que podem comprometer a eficiência do processo fermentativo (CANILHA et al., 2009).

Para neutralização dos inibidores, alguns métodos devem ser empregados como eletrodialise, filtração, adição de carvão ativado e hidróxidos. Como todos estes métodos de desintoxicação têm alguns efeitos colaterais, principalmente a redução no rendimento de

açúcares extraídos, a biodetoxificação, usando micro-organismos para consumir os inibidores, é uma alternativa atraente (HOU-RUI et al., 2009).

Uma linhagem selvagem de *Geotrichum sp.* (isolado VT01) foi identificado como produtor de xilitol com o maior rendimento (g/g) em meio sintético entre os vinte isolados avaliados. O objetivo deste capítulo foi avaliar a capacidade desta em produzir xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, bem como a sua tolerância aos inibidores presentes no referido substrato.

3.2 Material e Métodos

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HACA) foi obtido se misturando bagaço de cana de açúcar e ácido sulfúrico (3% v/v) com proporção líquido : sólido de 5 mL : 1 g. Esta mistura foi armazenada à temperatura ambiente por 24 horas e, após este prazo, autoclavada (121 °C) por 40 minutos. Após alcançar a temperatura ambiente, a mistura foi prensada (até 15 toneladas) e a fase líquida teve o pH ajustado para 5,0 pela adição de hidróxido de cálcio.

Para reativação de *Geotrichum sp.* VT01, preservado em água destilada esterilizada, o mesmo foi cultivado em Agar Sabouraud por 48 horas a 30 °C. O pré-inóculo foi preparado se cultivando uma alçada da levedura em meio líquido YGX (extrato de leveduras 15 g/L, glicose 20g/L, xilose 20 g/L e pH 5,0), incubado a 30 °C e 120 rpm. Após 72 horas, as culturas em YGX foram centrifugadas e o sedimento usado como inóculo.

Para avaliar a capacidade de produção de xilitol em HACA, foi utilizado delineamento central composto rotacional, com variáveis e níveis destas estabelecidos conforme tabela 8.

Tabela 8: Variáveis e níveis dos ensaios utilizando delineamento central composto rotacional (Statistica 6.0®).

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Concentração de uréia (g/L)	0	0,5	1,25	2,0	2,5
Temperatura (°C)	25	25	30	35	35
Inóculo (g/L)	2,31	3	4	5	5,68

O delineamento experimental foi executado em um total de 16 ensaios, incubados em agitador orbital (120 rpm) por 120 horas, em condições conforme detalhamento da tabela 9. Foram consideradas como variáveis de resposta o rendimento de xilitol (g/g) e o consumo dos inibidores do crescimento microbiano formados durante a hidrólise (%).

Tabela 9: Detalhamento dos ensaios de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Ensaios	Concentração de uréia (g/L)	Temperatura (°C)	Inóculo (g/L)
1	0,50	25	3,00
2	0,50	25	5,00
3	0,50	35	3,00
4	0,50	35	5,00
5	2,00	25	3,00
6	2,00	25	5,00
7	2,00	35	3,00
8	2,00	35	5,00
9	0,00	30	4,00
10	2,50	30	4,00
11	1,25	25	4,00
12	1,25	35	4,00
13	1,25	30	2,31
14	1,25	30	5,68
15 (c)	1,25	30	4,00
16 (c)	1,25	30	4,00

Legenda: (c) – Ponto central

As concentrações de cada açúcar presente no hidrolisado hemicelulósico (xilose, arabinose, galactose, celobiose e glicose), ácido acético, bem como dos produtos etanol e xilitol, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando a coluna Rezex RPM-Monosaccharides Pb⁺² 8% (Phenomenex, EUA), com fase móvel água, fluxo de 0,6 mL/min e detector de índice de refração modelo RID-10A (Shimadzu).

As concentrações de furfural, hidróxi-metil-furfural e compostos fenólicos totais foi determinada por HPLC utilizando coluna C18, eluição isocrática de acetonitrila : água (razão 1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 1mL/min e detecção por ultra-violeta ($\lambda = 280$ nm) em detector UV-Vis SPD10 AV (Shimadzu).

3.3 Resultados e Discussão

As concentrações de cada componente do hidrolisado hemicelulósico se encontram na tabela 10. Conforme estimado no capítulo 1, o mesmo apresenta elevado teor de inibidores, o que o constitui substrato inóspito, favorecendo a produção de xilitol face ao estresse osmótico.

Tabela 10: Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar empregado nos ensaios de fermentação

Componente	Concentração
Xilose	52,46 g/L
Arabinose	6,58 g/L
Galactose	1,82 g/L
Celobiose	ND
Glicose	5,52 g/L
Ácido Acético	1,93 g/L
Furfural	3,60 g/L
Hidróxi-metil-furfural	0,92 g/L
Compostos fenólicos totais	461,0 mg/L

Legenda: ND – Não detectado

Comparados aos valores obtidos por Vargas Betancur e Pereira Júnior (2010), as concentrações de D-xilose e ácido acético obtidas neste ensaio correspondem, respectivamente, a 86,8% e 28,3% das obtidas pelos autores; sendo ainda ora obtidos 3 vezes mais furfural e 10 vezes mais hidróxi-metil-furfural. Os resultados confirmam que o elevado grau de severidade empregado favorece a formação de furfural e hidróxi-metil-furfural, diminuindo a concentração de xilose no hidrolisado.

Após 120 horas, se observou que a glicose foi totalmente consumida em todos os 16 ensaios, sendo esta provavelmente o substrato para a produção de etanol. Evidencia-se este fato tendo em vista que *Geotrichum sp.* VT01 não produziu etanol quando D-xilose foi fornecida como fonte única de carbono (capítulo 2).

A presença de celobiose após o processo fermentativo se explica por este dissacarídeo constituir, provavelmente, um soluto compatível, isto é, produzido em resposta ao estresse osmótico proporcionado pelo meio. É comum que outros dímeros de glicose, como maltose e trealose, sejam produzidos como solutos compatíveis, sintetizados por leveduras e bactérias em situações de estresse osmótico (EMPADINHAS e COSTA, 2005). A composição final de cada ensaio é apresentada na tabela 11.

Tabela 11: Composição final de cada ensaio após 120 horas de fermentação.

Ensaio	Componente											
	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Galactose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	CFT (mg/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento xilitol (g/g)
1	1,26	1,80	0,16	1,38	ND	0,24	0,05	0,14	452,8	0,48	23,12	0,45
2	1,20	0,60	0,80	1,42	ND	0,34	0,04	0,13	435,0	0,62	19,24	0,38
3	1,38	1,56	0,22	0,34	ND	1,90	0,04	0,13	445,0	0,94	23,02	0,45
4	1,34	1,96	0,30	0,98	ND	0,24	0,05	0,15	437,8	0,44	24,04	0,47
5	28,72	5,42	0,06	0,46	ND	ND	0,07	0,21	458,4	0,76	14,36	0,60
6	1,10	0,58	0,20	1,88	ND	ND	0,02	0,11	430,4	0,68	19,62	0,38
7	1,52	1,28	0,34	0,32	ND	0,24	0,06	0,16	431,8	0,76	22,34	0,44
8	1,52	2,22	0,16	0,72	ND	0,94	0,07	0,17	444,6	0,56	25,94	0,51
9	1,36	2,28	0,20	0,44	ND	1,20	ND	0,15	431,8	0,36	26,82	0,52
10	1,24	0,46	0,14	0,74	ND	ND	0,07	0,18	418,3	0,70	22,46	0,44
11	1,28	0,56	0,16	1,02	ND	0,60	0,06	0,15	433,9	0,16	23,02	0,45
12	2,28	0,54	0,16	1,08	ND	0,46	ND	0,15	396,6	ND	23,74	0,46
13	1,54	1,94	0,18	0,32	ND	ND	0,06	0,16	438,2	1,04	24,70	0,49
14	1,72	0,80	0,06	1,20	ND	0,36	0,05	0,15	411,2	0,70	18,74	0,37
15	1,26	0,38	0,14	0,80	ND	ND	0,05	0,13	424,3	0,44	23,22	0,45
16	1,26	0,48	0,14	0,88	ND	ND	ND	0,14	418,6	0,54	20,56	0,40

Legendas: ND – Não detectado; HMF – Hidroxi-metil-furfural; CFT – Compostos fenólicos totais

O máximo rendimento de xilitol (0,60 g/g) foi obtido no ensaio 5, sendo que a análise estatística indicou interferência significativa entre os fatores “inóculo (g/L)” e “temperatura (°C)”, não havendo efeito significativo de nenhuma outra variável, conforme figura 9 e tabela 13. Este resultado é superior ao obtido por Carvalho et al. (2007), quando cultivando *Candida guilliermondii* em HACA. O rendimento médio dos 16 ensaios (0,45 g/g), foi similar ao obtido por Cunha et al. (2009) utilizando *C. guilliermondii* imobilizada em PVA-hidrogel para produção de xilitol em HACA.

O consumo de furfural foi em média de 98,8%, tendo havido consumo total nos ensaios 9, 12 e 16. Foram consumidos ainda 83,6 e 78,9% de hidroxi-metil-furfural e ácido acético, respectivamente. Os valores obtidos para consumo de furfural e ácido acético são semelhantes aos obtidos por Hou-Rui et al. (2009) quando empregando isolados selvagens de *Issatchenkia orientalis* e *I. occidentalis* para detoxificação de HACA. Estas linhagens consumiram completamente estes inibidores, sendo que a concentração de furfural empregada por estes autores foi consideravelmente menor que a fornecida para *Geotrichum sp.* VT01, indicando alguma vantagem desta última em consumir este inibidor.

Não houve diferença significativa entre as concentrações iniciais e finais de compostos fenólicos totais, fato aparentemente explicado pela baixa concentração destes quando comparado aos demais compostos presentes no hidrolisado.

Nenhum dos fatores analisados apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) para consumo dos inibidores furfural, e ácido acético (tabela 13). Este fato deu-se em função de que estes foram consumidos em elevadas taxas, independente de níveis e/ou fatores (tabela 12). Quanto ao consumo de hidroximetilfurfural, encontrou-se efeito significativo da variável “[uréia]”, além da interação entre os fatores “temperatura” e “inóculo” (Figura 10 e tabela 13).

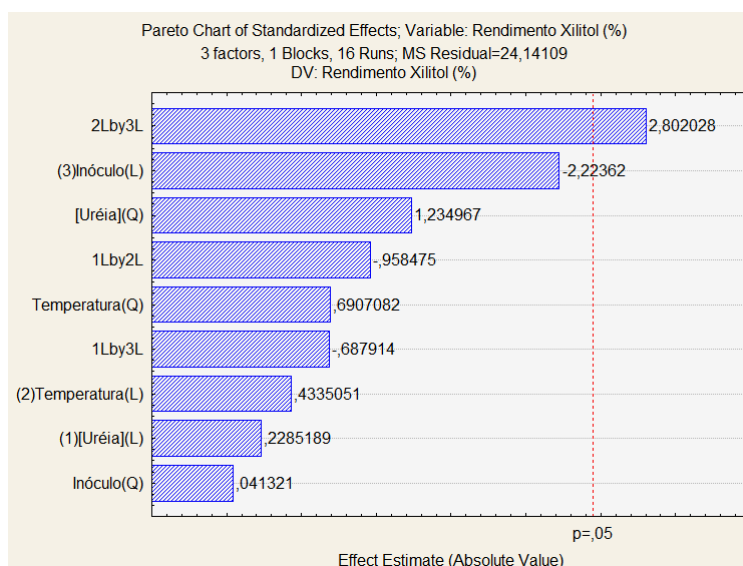


Figura 9: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para variável de resposta “Rendimento de xilitol (g/g)”.

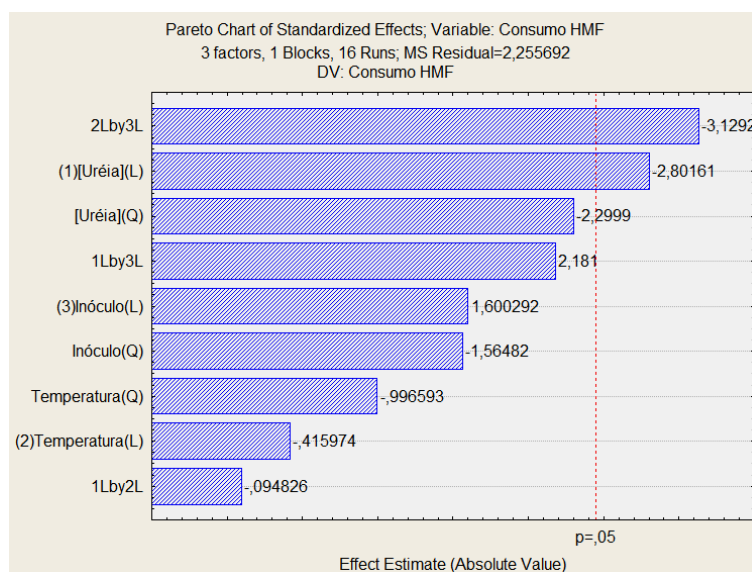


Figura 10: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados para variável de resposta “consumo de hidroximetilfurfural”.

Em se tratando de processo microbiano com linhagem selvagem, admitem-se como aceitáveis valores de R^2 acima de 0,75. Neste caso, o delineamento aplicado mostrou-se adequado à otimização somente do consumo de hidróxi-metil-furfural, ocorrendo consumo dos demais inibidores independente dos níveis das variáveis em análise.

Tabela 12: Consumos percentuais dos inibidores ácido acético, furfural e hidróxi-metil-furfural.

Ensaio	Variáveis		
	Consumo de ácido acético (%)	Consumo de furfural (%)	Consumo de hidróxi-metil-furfural (%)
1	87,56	98,48	84,53
2	82,38	98,77	85,16
3	1,55	98,77	85,36
4	87,56	98,54	83,66
5	100	98,04	77,64
6	100	99,62	87,22
7	87,56	98,29	82,59
8	51,30	98,13	81,21
9	37,82	100	83,52
10	100	98,04	80,25
11	68,91	98,40	83,87
12	76,17	100	83,53
13	100	98,29	82,39
14	81,35	98,49	83,43
15	100	98,64	86,29
16	100	100	84,89

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) de cada fator para as variáveis de resposta “rendimento de xilitol” e consumo dos inibidores furfural, hidróxi-metil-furfural e ácido acético.

Variáveis	Valor de “p” para cada variável de resposta ($\alpha = 0,05$)			
	Rendimento de xilitol (g/g)	Consumo de furfural (%)	Consumo de HMF (%)	Consumo de ácido acético (%)
(1) [Uréia] (L)	0,826832	0,233780	0,031098	0,101473
[Uréia] (Q)	0,263007	0,536727	0,061109	0,231636
(2) Temperatura (L)	0,679800	0,616329	0,691897	0,222601
Temperatura (Q)	0,515566	0,696446	0,357441	0,282859
(3) Inóculo (L)	0,067859	0,544932	0,160652	0,894556
Inóculo (Q)	0,968381	0,175467	0,168661	0,686726
1L by 2L	0,374836	0,569786	0,927541	0,796446
1L by 3L	0,517204	0,556002	0,071962	0,159868
2L by 3L	0,031081	0,340492	0,020344	0,480361
R^2	0,73168	0,52756	0,83737	0,65094

Para todas as variáveis de resposta consideradas neste capítulo, a ferramenta de predição de otimização indicou como condições ótimas as utilizadas no ponto central, isto é, inóculo de 4,0 g/L, concentração de uréia a 1,25 g/L e temperatura a 30 °C. Conjuntamente, os resultados

sugerem que *Geotrichum sp.* VT01 seja mais promissora em efetuar detoxificação, pelo consumo de furfural, do que na produção de xilitol, sendo necessário caracterizar o comportamento desta linhagem na presença do referido inibidor.

3.4 Conclusões

Geotrichum sp. VT01 é hábil em produzir xilitol a partir de D-xilose, com rendimento semelhante ao observado para outras espécies tradicionalmente empregadas na produção.

Esta linhagem é hábil em consumir furfural e ácido acético, independentemente dos fatores avaliados, sendo eficiente em consumir hidroximetil-furfural nas condições utilizadas no ponto central do delineamento utilizado.

A habilidade em produzir xilitol e consumir furfural evidenciam a aplicabilidade desta em processo de produção de xilitol simultâneo a biodetoxificação de hidrolisado hemicelulósico.

3.5 Referências Bibliográficas

- ARANDA-BARRADAS, J. S.; GARIBAY-ORIJEL, C.; BADILLO-CORONA, J. A.; SALGADO-MANJARREZ, E. (2010). A stoichiometric analysis of biological xylitol production. *Biochemical Engineering Journal*. 50: 1–9. DOI: 10.1016/j.bej.2009.10.023
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. (2009). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-009-8792-8
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. (2007). Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 43 (1): 47-53.
- CUNHA, M. A. A.; CONVERTI, A.; SANTOS, J. C.; FERREIRA, S. T. S.; SILVA, S. S. (2009). PVA-Hydrogel Entrapped *Candida guilliermondii* for Xylitol Production from Sugarcane Hemicellulose Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*. 157:527–537. DOI 10.1007/s12010-008-8301-5

- EMPADINHAS, N.; COSTA, M. S. (2005). Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *International Microbiology*. 9: 199 – 206.
- GUO, P.; WANG, Q.; LIU, J.; LIU, L.; ZHAO, P.; CAO, Y.; LIU, Y.; QI, C. (2013). Preparation of Two Organoselenium Compounds and Their Induction of Apoptosis to SMMC-7221. *Cells Biological Trace Elements Research*. 154: 304-311. DOI: 10.1007/s12011-013-9715-7
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S.S.; SARROUH, B.F.; AI-HUA, C.; YUHENG, Z.; KE, J.; QIU, X. (2009). Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 152: 199–212. DOI: 10.1007/s12010-008-8249-5
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. (1997) Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnology Letters*. 19(5): 407–409.
- MEURMAN, J. H. (2012). Functional foods/ingredients and oral mucosal diseases. *European Journal of Nutrition*. 51 (2): 31–38. DOI: 10.1007/s00394-012-0324-6
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. (1996). Xylitol from wood: study of some operational strategies. *Food Chemistry*. 51(4): 531-535.
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. (1998). Biotechnological production of xylitol. part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technol.* 65: 191-211.
- SAHA, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 279–291.
- VARGAS BETANCUR, G. J.; PEREIRA JUNIOR, N. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (3). DOI: 10.2225/vol13-issue3-fulltext-3

CAPÍTULO 4: Caracterização do consumo de Furfural por *Geotrichum sp.* VT01 em Ensaio de Biodetoxificação.

4.1 Introdução

O Furfural (2-Furaldeído, Furano-2-Carboxaldeído, C₅H₄O₂) é uma molécula gerada principalmente pela oxidação de pentoses. É comumente encontrado em hidrolisados hemicelulósicos (HH) em função dos pré-tratamentos empregados para sacarificação. Em processos de fermentação de HH, atua como fator limitante por inibir o crescimento microbiano, inibindo a transcrição e tradução gênica, além de inibir a ação de diversas enzimas (ZHANG et al., 2013).

Atualmente, a preocupação com este composto e seus isômeros é crescente, pois estes causam irritação cutânea, respiratória e ocular grave, além de serem suspeitos de causar câncer. Recentemente têm sido reportados como contaminantes de mel (ISLAM et al., 2014), e em alimentos industrializados como leite (SAKKAS et al., 2014) e sucos de frutas cítricas (ÁLVAREZ et al., 2014). Neste contexto, estudos que visem o desenvolvimento de processos para remover estes compostos se tornam uma alternativa interessante, podendo beneficiar tanto a indústria da fermentação quanto a indústria alimentícia.

Em um ensaio anterior (capítulo 3), o isolado VT01 (denominado *Geotrichum sp.* VT01) apresentou elevado potencial no consumo de ácido acético, hidroximetil-furfural e furfural, com destaque para este último. Em um total de 16 ensaios, *Geotrichum sp.* VT01 consumiu mais de 90% do furfural presente, não sendo possível detectar este inibidor em pelo menos três destes. Este resultado indicou elevado potencial desta linhagem na detoxificação de HH pelo consumo de furfural.

O objetivo deste capítulo foi caracterizar o consumo de furfural por *Geotrichum sp.* VT01, analisando a produção de biomassa por este micro-organismo na presença do referido inibidor.

4.2 Material e Métodos

Geotrichum sp. VT01, preservado pelo método de Castelanni, foi reativado por cultivo em placas contendo Ágar Sabouraud, incubadas a 30 °C por 48 horas. A seguir, alçadas destas

culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo YPD e incubados a 30 °C por 48 horas a fim de produzir biomassa, a ser utilizada como inóculo nos ensaios de biodetoxificação.

As culturas em meio líquido foram centrifugadas a 3500 *xg* (40 minutos, 4 °C), se descartando o sobrenadante e usando o sedimento como inóculo. A biomassa inoculada em cada ensaio de biodetoxificação foi em média de 4,08 g/L (peso seco), calculado por desidratação em estufa a 70 °C até a obtenção de peso constante.

Para caracterizar a capacidade de biodetoxificação e consumo de Furfural como fonte de carbono, foi utilizada a metodologia descrita por Hou-Rui et al.(2009), com modificações. *Geotrichum sp.* VT01 foi submetido a diferentes substratos, com concentrações de Furfural e glicose variando de acordo com o discriminado na tabela 14. Todos os ensaios foram suplementados com 6,7 g/L de YNB, sendo efetuados em triplicata.

Tabela 14: Detalhamento dos ensaios de biodetoxificação e consumo de Furfural como fonte única de carbono.

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Furfural (g/L)
GF2	20,0	2,00
GF4	20,0	4,00
GF6	20,0	6,00
GF8	20,0	8,00
F2	–	2,00
F4	–	4,00
C	20,0	–

Legendas: (GF2) – Glicose + Furfural 2,0 g/L; (GF4) – Glicose + Furfural 4,0 g/L; (GF6) – Glicose + Furfural 6,0 g/L; (GF8) – Glicose + Furfural 8,0 g/L; (F2) – Furfural 2,0 g/L; (F4) – Furfural 4,0 g/L; (C) – Controle.

A cada 12 horas, uma alíquota de cada ensaio foi coletada e caracterizada quanto ao crescimento celular e consumo de Furfural. O crescimento celular foi mensurado por densidade ótica a 600 nm (OD_{600}), e a concentração de Furfural foi determinada por HPLC utilizando coluna C18, eluição isocrática de acetonitrila : água (razão 1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 1mL/min e detecção por ultra-violeta ($\lambda = 280$ nm) em detector UV-Vis SPD10 AV (Shimadzu). Para calcular a concentração de furfural, foi usada a fórmula $[C_F = (A_P - 3,4931)/0,0505]$, onde C_F é a concentração de furfural, A_P é a área dos picos dos cromatogramas, obtida a partir da curva padrão apresentada na figura 11.

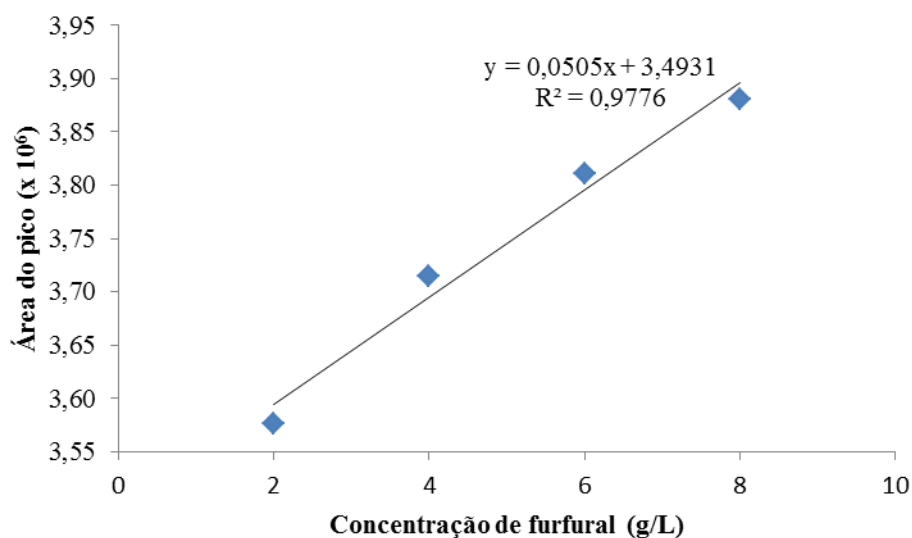


Figura 11: Curva padrão para cálculo das concentrações de furfural a partir das áreas dos picos dos cromatogramas.

Para analisar a significância das diferenças encontradas, os valores obtidos de concentração final de Furfural e OD₆₀₀ final de cada ensaio foram analisados por Teste de Kruskal-Wallis (StatSoft 6.0; $\alpha = 0,05$).

Para caracterizar a detoxificação, isto é, analisar os produtos de degradação do furfural, *Geotrichum sp.* VT01 foi cultivado por 120 horas, a 30 °C e 120 rpm em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio constituídos por YNB (6,7 g/L), furfural (6,0 g/L) e diferentes fontes de carbono, constituídos segundo a tabela 15.

Tabela 15: Detalhamento dos ensaios de caracterização de detoxificação com diferentes fontes de carbono.

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Xilose (g/L)	Concentração de Furfural (g/L)
GF	40,0	–	6,00
XF	–	40,0	6,00
GXF	20,0	20,0	6,00
C	40,0	–	–

Ao final deste prazo, uma alíquota de cada ensaio foi analisada por sistema integrado de cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massas (LC-MS) usando cromatógrafo Acella® (Thermo Scientific), operando simultaneamente com detector PDA-UV (LC) e um detector TSQ Quantum Acess (MS). O método cromatográfico foi ajustado com uma coluna Kinetex C18 (2,6 μ , 100 A, 100 x 4,6 mm, Phenomenex-USA). O sistema de espectrometria de massas também foi usado para análise por inserção direta de alíquotas dos

ensaios, sendo que, para tal análise, as alíquotas foram diluídas (concentração final 10^{-1}) em metanol PA. Considerando que o espectrômetro de massas em questão ioniza os compostos em análise pela adição de um próton, todas as massas são expressas nos espectrogramas acrescidas de uma unidade.

4.3 Resultados e Discussão

A análise dos ensaios GF2, GF4 e GF6 evidenciou o consumo de furfural em sua totalidade, não sendo este inibidor detectável a partir de 96 horas de cultivo. O ensaio GF8 resultou no consumo máximo de 96,12% de Furfural, observado após 84 horas. Quando furfural foi fornecido como fonte única de carbono (ensaios F2 e F4), obteve-se consumo de 93,0% e 88,5%, respectivamente. A análise estatística indicou que não houve diferença significativa entre as concentrações finais de furfural dos ensaios ($p = 0,067$). Os resultados de consumo de Furfural ao longo das 120 horas de cultivo são apresentados na figura 12.

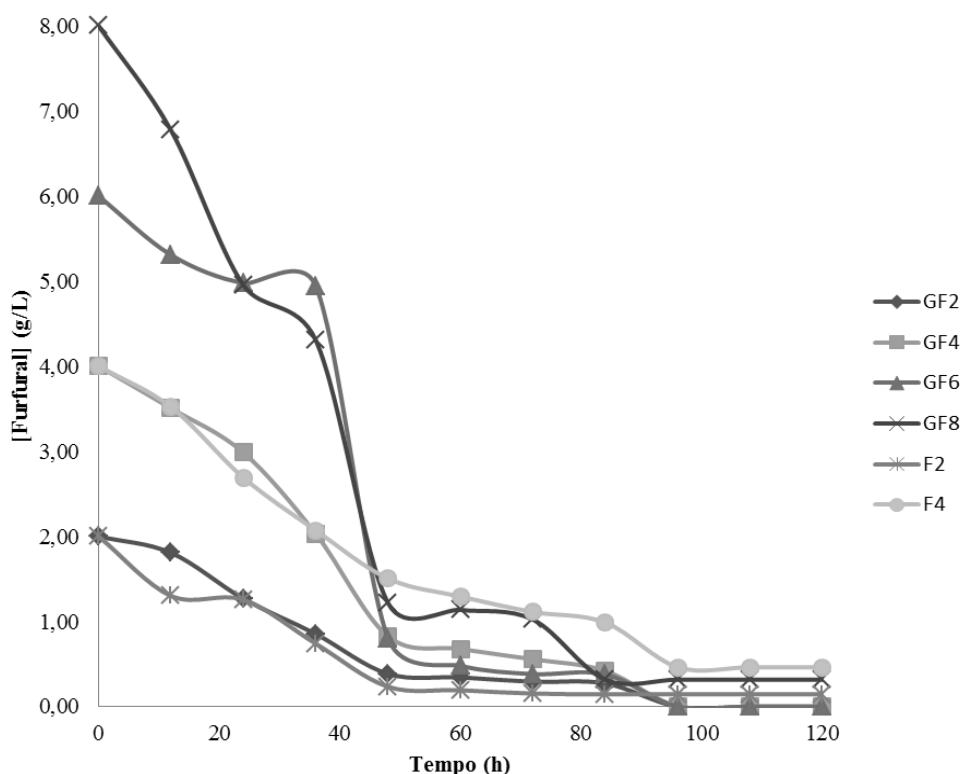


Figura 12: Concentrações de furfural em cada ensaio ao longo de 120 horas de cultivo.

As curvas de crescimento dos ensaios C, GF2, GF4 e GF6 indicaram crescimento celular sem ocorrência de fase *lag*, com crescimento exponencial até as 12 horas de cultivo,

seguido por fase estacionária até a interrupção dos ensaios (120 horas). O ensaio GF8 não apresentou crescimento celular, indicando que a concentração de 8,00 g/L de furfural inibe o crescimento de *Geotrichum sp* VT01. Os ensaios F2 e F4 apresentaram decréscimo na densidade óptica, indicando que, embora seja hábil para consumir furfural, *Geotrichum sp.* VT01 é incapaz de usá-lo como fonte de carbono para produção de biomassa. Este resultado confirma o potencial desta linhagem para efetuar biodetoxificação. As curvas de crescimento são apresentadas integralmente na figura 13.

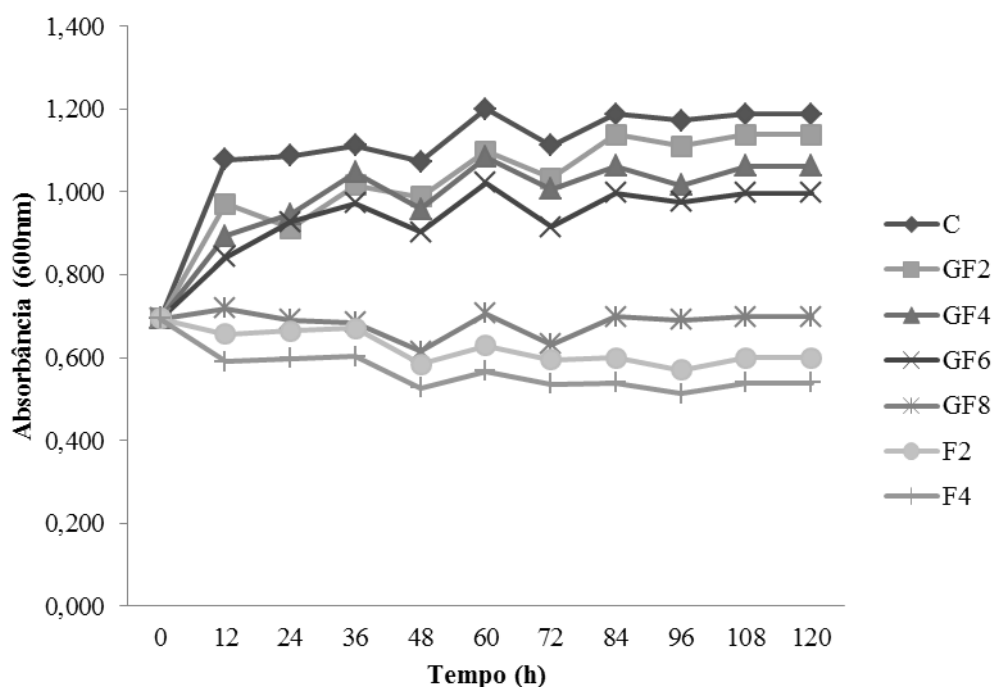


Figura 13: Curvas de crescimento dos ensaios de consumo de furfural.

Os valores finais de densidade óptica dos ensaios C, GF2, GF4 e GF6 não apresentaram diferença significativa ($p = 0,056$), assim como não houve diferença significativa entre os ensaios GF8, F2 e F4 ($p = 0,069$). Todavia, os dados diferem significativamente quando comparados todos os ensaios ($p = 0,018$), confirmando que a concentração de 8 g/L de furfural afeta de forma significativa o crescimento de *Geotrichum sp.* VT01.

As análises por LC-MS confirmaram o completo consumo de furfural quando fornecida glicose como fonte única de carbono. O cromatograma indica três picos de absorbância em comprimento de onda na faixa do ultra-violeta (figura 14), com tempos de retenção a 0,55, 0,87 e 4,20 minutos. O espectro de massas de cada pico foi analisado

individualmente. Os espectrogramas apresentados na figura 15 indicam a ausência de furfural (PM = 96 g/mol) quando glicose foi fornecida como fonte única de carbono, ao passo que na presença de D-xilose o mesmo não foi completamente consumido.

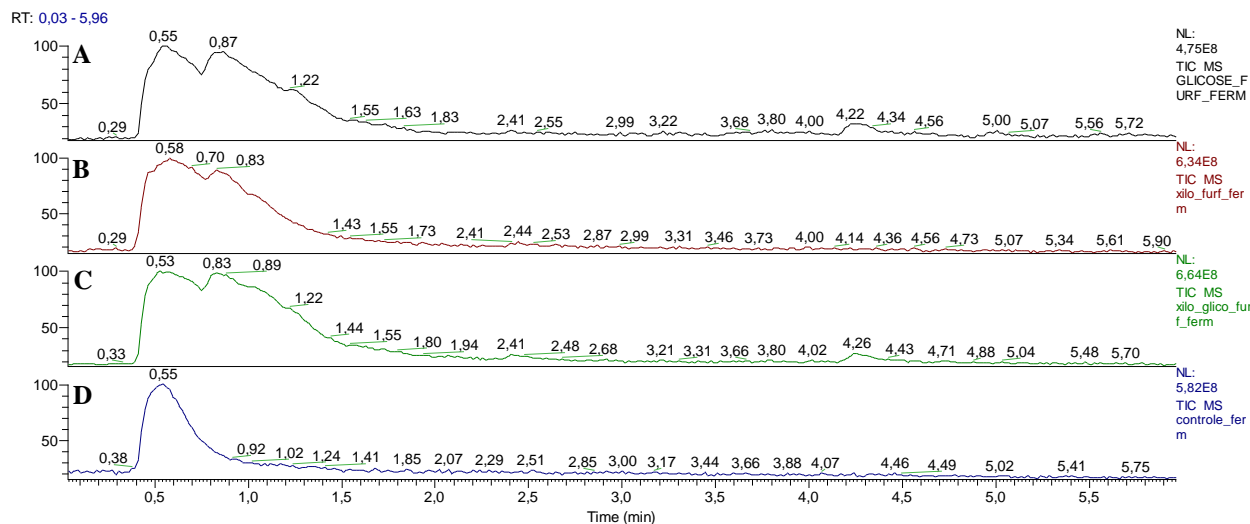


Figura 14: Cromatograma na faixa do UV, indicando a presença de três picos nas amostras com furfural e glicose (A e C), dois quando D-xilose foi fornecida como fonte única de carbono (B) e um único pico no ensaio controle (D).

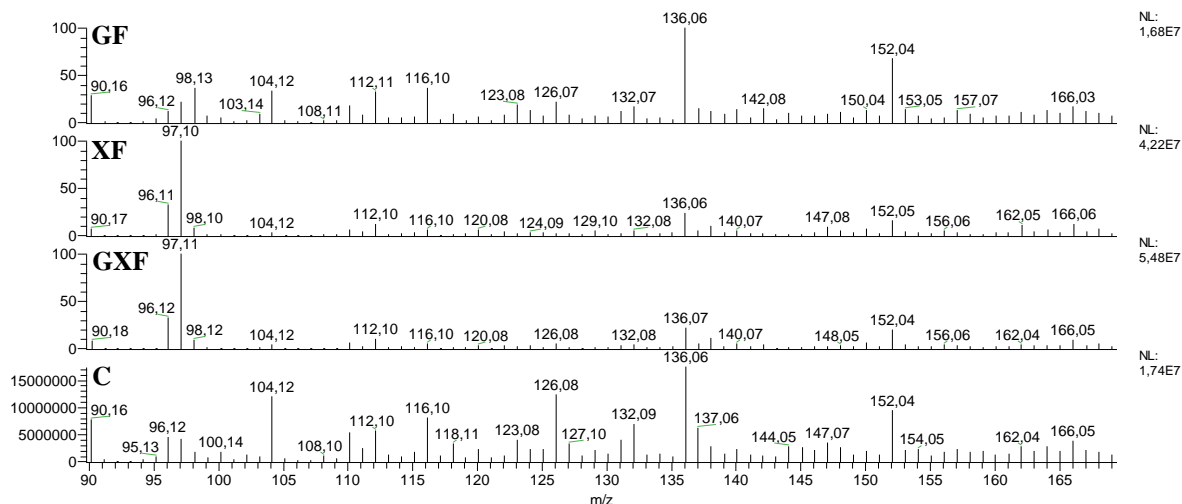


Figura 15: Espectrograma de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 0,55 minutos), dos ensaios de consumo de furfural. Note-se a ausência de furfural usando glicose como fonte única de carbono (ensaio GF), e a presença deste quando usadas fontes de carbono xilose (XF), e xilose + glicose (GXF).

A despeito da inibição do consumo de furfural na presença de D-xilose, a abundância desta pentose em HACA não inibiu o completo consumo do inibidor neste substrato (dados do capítulo 3). Este fato se deu provavelmente porque o consumo de furfural em HACA é potencializado por outros componentes presentes neste meio complexo, ausentes no meio quimicamente definido.

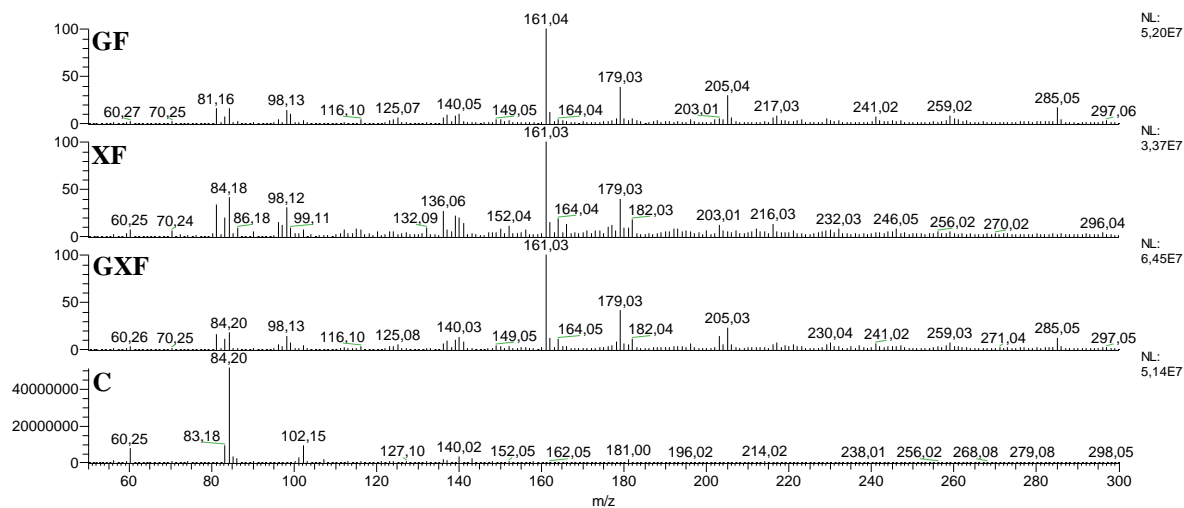


Figura 16: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 0,87 minutos). Notar composto de peso molecular 161 g/mol presente nos ensaios em que se forneceu furfural a levedura.

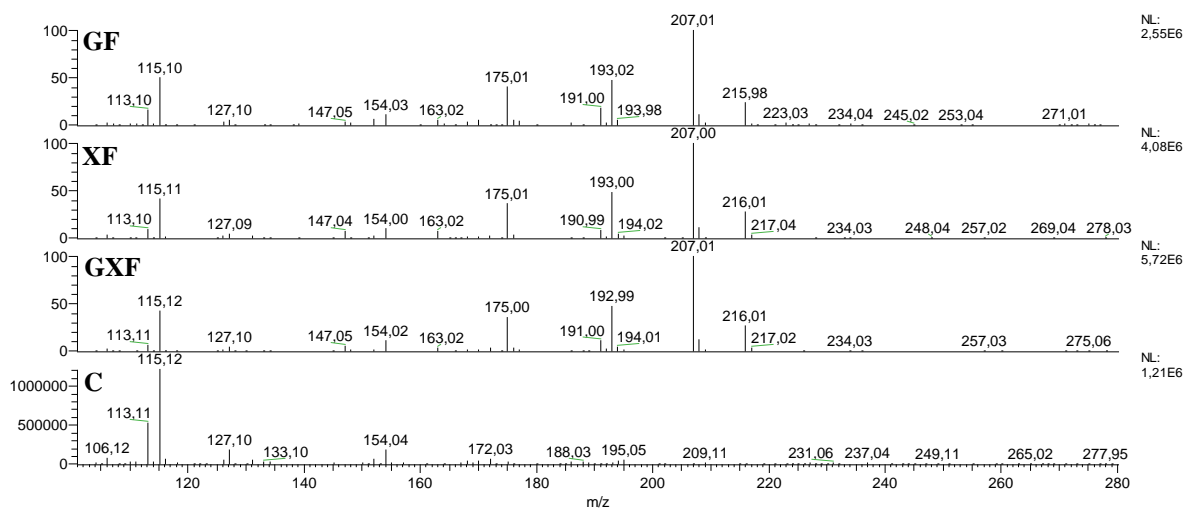


Figura 17: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 2,44 minutos).

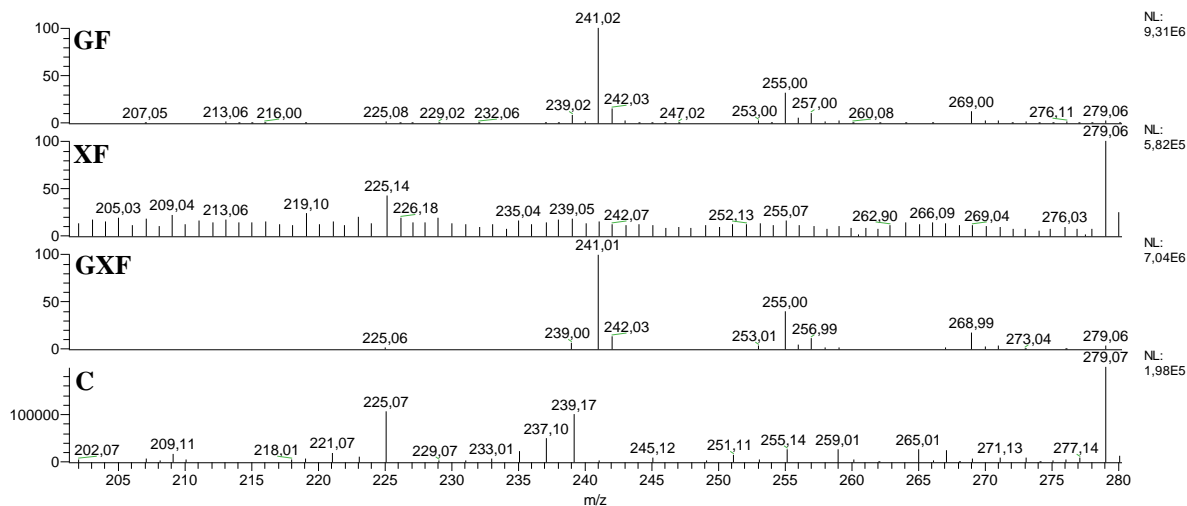
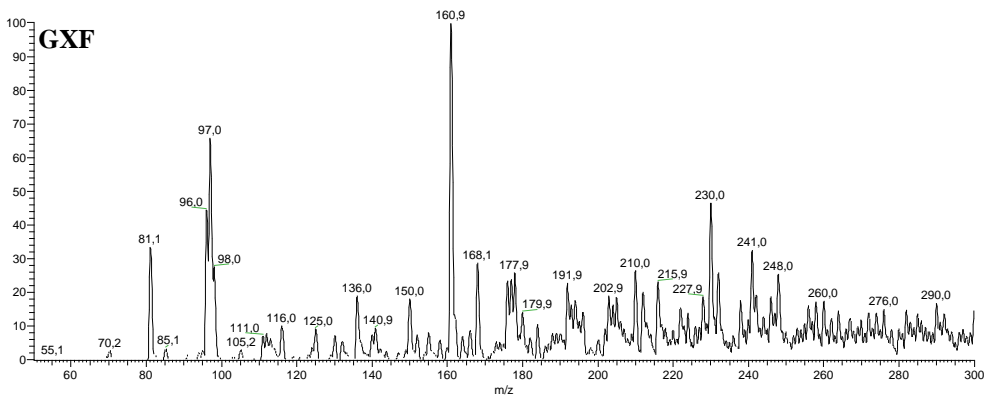
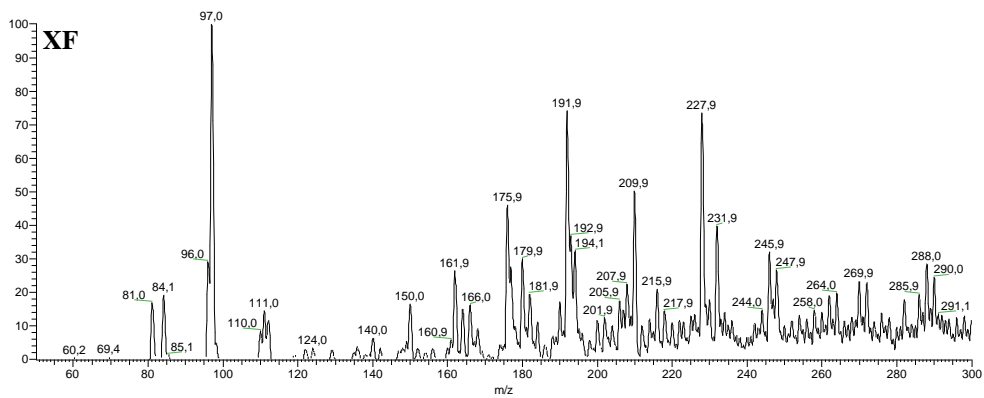
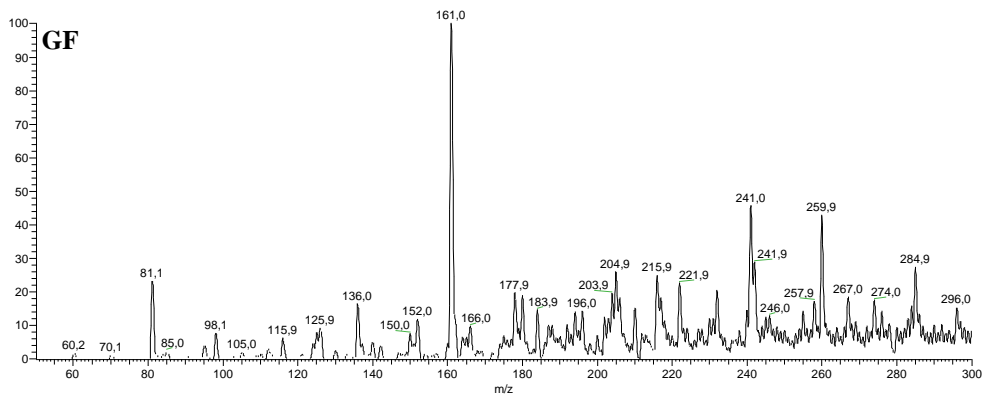


Figura 18: Espectrometro de massas, obtido por sistema LC-MS (tempo de retenção: 6,16 minutos).



Italo3 #938-966 RT: 13,70-14,11 AV: 29 SM: 7B NL: 5,22E6
T: +p APCI Q1MS [50,070-300,000]

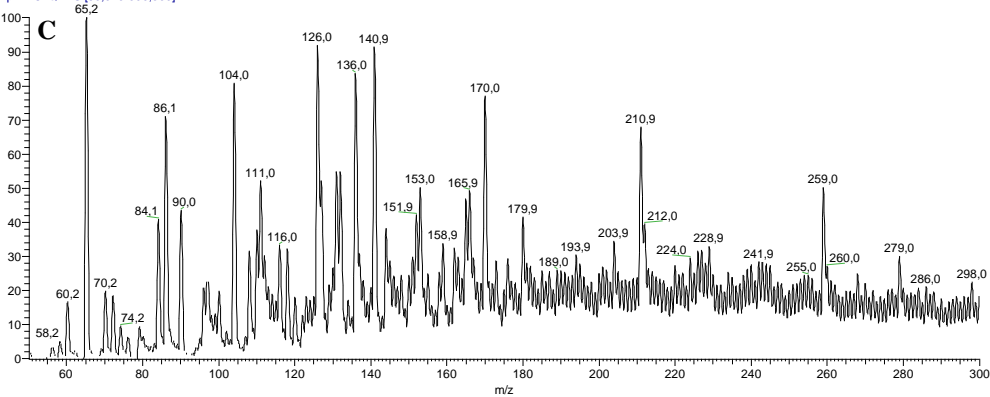


Figura 19: Espectrogramas obtidos por inserção direta das amostras no espectrometro de massas.

Considerando a incapacidade de *Geotrichum sp.* VT01 em usar furfural como fonte de carbono, se admite que este inibidor seja metabolizado a fim de ser transformado em uma molécula menos tóxica. Em humanos e roedores, furfural é metabolizado inicialmente por conversão em ácido furóico ($C_5H_4O_3$, PM = 112 g/mol), sendo a seguir complexado com o aminoácido glicina, formando 2-Furoil-glicina ($C_7H_7O_4N$, PM = 169 g/mol) por uma reação que tem a coenzima A como intermediária. Como pode haver reação de condensação com Acetil-CoA, pode ser formado também ácido 2-furano-acrílico ($C_7H_6O_3$, PM = 138 g/mol), o qual se condensa com a glicina formando 2-furanacriloilglicina ($C_9H_9O_4N$, PM = 195 g/mol). Ambas as formas nitrogenadas são excretadas na urina destes animais (KROES, 1999).

Entre os micro-organismos, o metabolismo de furfural ocorre comumente pela conversão deste em ácido furóico e/ou álcool furfurílico ($C_5H_6O_2$, PM = 98 g/mol), os quais são posteriormente transformados em ácido 2-oxoglutárico ($C_5H_6O_5$, PM = 146 g/mol), o qual é metabolizado pelo ciclo dos ácidos tri-carboxílicos. Todavia, não há evidências de que haja maquinaria enzimática específica para tal, sendo este consumido em co-metabolismo com outrem, provavelmente açúcares (DONG e BAO, 2010).

Os presentes resultados sugerem que *Geotrichum sp.* VT01 consome furfural em co-metabolismo com glicose. Este resultado difere do obtido por Ran et al. (2014) quando utilizando *Amorphotheca resiniae* para consumo de furfural e hidroximetil-furfural. A referida levedura consumiu furfural completamente em até 32 horas de cultivo, mas na ausência de glicose, produzindo álcool furfurílico e ácido furóico; ao passo que a presença de glicose inibiu o completo consumo de furfural.

Niel et al. (2012) encontraram consumo de furfural e hidroximetil-furfural por *Lactobacillus reuteri* associado a presença de glicose. Todavia, as concentrações utilizadas por estes autores (furfural 1g/L e hidroximetil-furfural 0,5 g/L) foram consideravelmente menores que as ora empregadas, o que indicam que *Geotrichum sp.* VT01 é bem mais promissora que *L. reuteri* em efetuar biodetoxificação.

Não há evidências de que os produtos da degradação do furfural por *Geotrichum sp.* VT01 sejam os usualmente descritos na literatura. Os espectrogramas obtidos por sistema LC-MS (tempo de retenção: 0,87; 2,44 e 6,16 minutos) indicam que na presença de furfural, a levedura produziu compostos com pesos moleculares 160 e 178 g/mol (figura 16); 174, 192, 207 e 215 g/mol (figura 17) e, por fim, 241 g/mol (figura 18).

A inserção direta de 10 μL de cada amostra no espectrômetro de massas indicou que o composto mais abundante entre os prováveis produtos do metabolismo de furfural apresenta peso molecular 160 g/mol, sendo este o mais abundante entre os demais produtos (figura 19). Como não há na literatura nenhum dos típicos produtos de degradação de furfural com este peso molecular, se supõe que o referido produto seja resultante da adição de um grupo alquil à função aldeído. Essa hipótese se sustenta tendo em vista que, quando misturados furfural e álcool PA (metanol : etanol : isopropanol), os espectrogramas (figura 20) indicam massas correspondentes ao somatório de furfural + alquil, a saber, 111,8 (furfural + metil), 124,8 (furfural + etil) e 138,8 g/mol (furfural + isopropil).

É, portanto, provável que furfural tenha sido mitigado por *Geotrichum sp.* VT01 por condensação deste a algum composto hidroxilado, produzido a partir dos substratos do meio de cultura, dependendo a produção deste da presença de glicose.

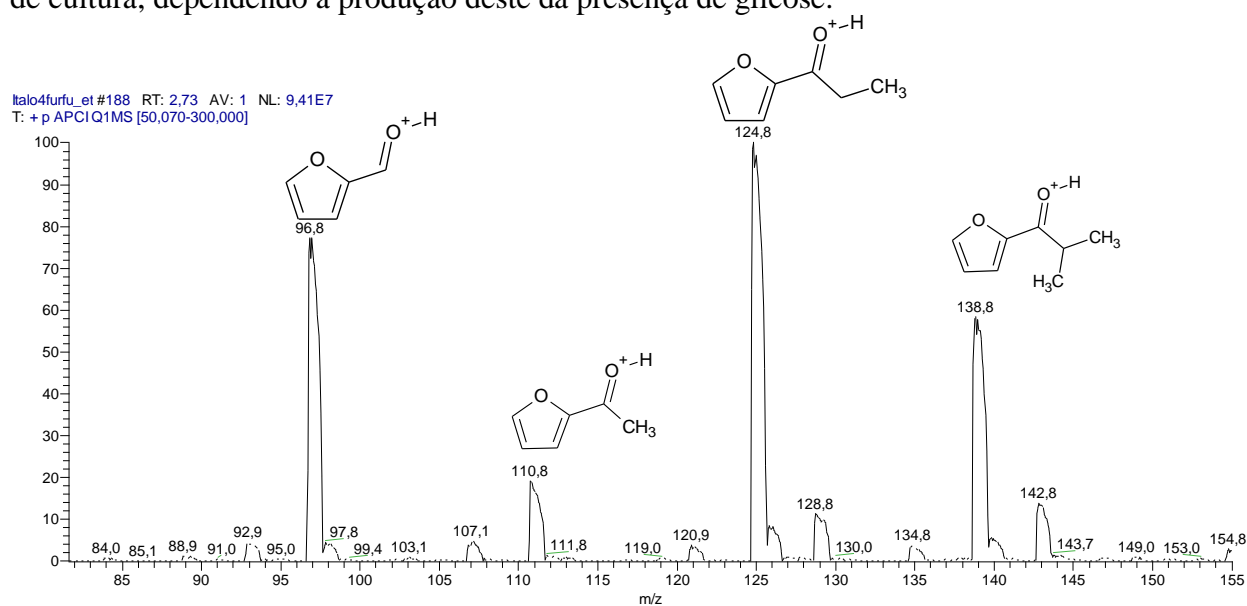


Figura 20: Espectrograma da mistura de furfural (PM: 96,8 g/mol) e álcool, evidenciando os produtos da reação com metanol (PM: 110,8 g/mol), etanol (PM: 124,8 g/mol) e isopropanol (PM: 138,8 g/mol).

Este é o primeiro trabalho a indicar a produção de um composto com essa característica a partir do metabolismo de furfural por micro-organismos. Considerando ser este o produto final do metabolismo de furfural, se faz necessário um estudo mais aprofundado, quer por fracionamento, quer por ressonância magnética, para elucidar a estrutura molecular do mesmo.

Leveduras hábeis em metabolizar furfural e demais inibidores derivados dos pré-tratamentos de lignocelulose são fundamentais para aplicação em biorrefinarias, sendo parte decisiva no completo aproveitamento da biomassa (MANDALIKA et al., 2014). A completa elucidação do metabolismo de furfural por *Geotrichum sp.* VT01 pode, portanto, representar avanços na aplicabilidade desta em processos industriais.

4.4 Conclusões

Geotrichum sp. VT01 é hábil em metabolizar furfural, liberando como principal produto deste metabolismo um composto de peso molecular 160 g/mol, cuja estrutura ainda é desconhecida.

A despeito de consumir furfural, este não é utilizado como fonte de carbono, havendo decréscimo de biomassa quando este se encontra a concentração de 8,00 g/L.

Os esforços subsequentes devem se concentrar em elucidar o metabolismo de furfural por esta linhagem a fim de esclarecer a real aplicabilidade desta em biorrefinarias.

4.5 Referências Bibliográficas

- ÁLVAREZ, J.; PASTORIZA, S.; ALONSO-OLALLA, R.; DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J.A. (2014). Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chemistry*. 164: 396-405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.047
- DONG, H.; BAO, J. (2010). Biofuel via Biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 6: 316 – 318.
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S.S.; SARROUH, B.F.; AI-HUA, C.; YUHENG, Z.; KE, J.; QIU, X. (2009). Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 152: 199–212. DOI: 10.1007/s12010-008-8249-5
- ISLAM, N.; KHALIL, I.; ISLAM, A.; GAN, S. H. (2014). Toxic Compounds in Honey. *Journal of Applied Toxicology*. 34: 733-742. DOI: 10.1002/jat.2952

- KROES, R. (1999). Furfural. *In: Safety Evaluation of Certain Food Additives*. Who Food Additives Series: 42. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je03.htm>
- MANDALIKA, A.; QIN, L.; SATO, T. K.; RUNGE, T. (2014). Integrated biorefinery model based on production of furans using open-ended high yield processes. *Green Chemistry*. 16: 2480 – 2489. DOI: 10.1039/c3gc42424c
- NIEL, E. W. J.; LARSSON, C. U.; LOHMEIER-VOGEL, E. K.; RADSTRÖM, P. (2012). The potential of biotransformation activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*. 152: 206 – 210. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.007
- RAN, H.; ZHANG, J.; GAO, Q.; LIN, Z.; BAO, J. (2014). Analysis of Biodegradation Performance of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural by *Amorphpthea resiniae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 7: 51. DOI 10.1186/1754-6834-7-51
- SAKKAS, L.; MOUTAFI, A.; MOSCHOPOULOU, E.; MOATSOU, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*. 159: 293-301. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.020
- ZHANG, D.; ONG, Y. L.; LI, Z.; WU, J. C. (2013) Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter sp.* FDS8. *Biochemical Engineering Journal* 72: 77– 82. DOI 10.1016/j.bej.2013.01.003

CONCLUSÕES GERAIS

O protocolo de hidrólise de biomassa empregado neste trabalho tem como fator, com maior efeito significativo, a razão sólido : líquido, havendo efeito negativo sobre as concentrações de açúcares obtidas a medida que se aumenta o volume de ácido empregado.

As 20 colônias de leveduras isoladas a partir do besouro *Veturius transversus* apresentam 11 perfis bioquímicos distintos, sendo metabolicamente similares a 11 espécies distintas, distribuídas em quatro gêneros. Todas são descritas na literatura como detentoras de pelo menos uma das características a seguir: secretoras de enzimas hidrolíticas e vitaminas, leveduras oleaginosas ou agentes de controle biológico, o que pode explicar o papel destes micro-organismos em associação ao besouro. A análise de regiões conservadas do genoma indicam que os isolados pertencem a três clados distintos, à saber, *Geotrichum sp.*, *Candida tropicalis* e *Williopsis saturnus*. Com exceção de dois isolados, todos produzem xilitol a partir de D-xilose, com destaque para *Geotrichum sp.* VT01, o qual foi selecionado para ensaio em processo fermentativo.

Quando cultivado em HACA, *Geotrichum sp.* VT01 produziu xilitol com rendimento médio de 0,45 g/g, sendo este um resultado relativamente comum. Sua notável habilidade em consumir furfural (> 98%) motivou a investigação a fim de caracterizar o metabolismo deste inibidor. Os resultados indicaram que a levedura não o usa como fonte de carbono, mas é sim hábil em consumi-lo na totalidade produzindo, em resposta a este, um composto de peso molecular 160 g/mol de estrutura ora desconhecida e sem similares descritos na literatura.

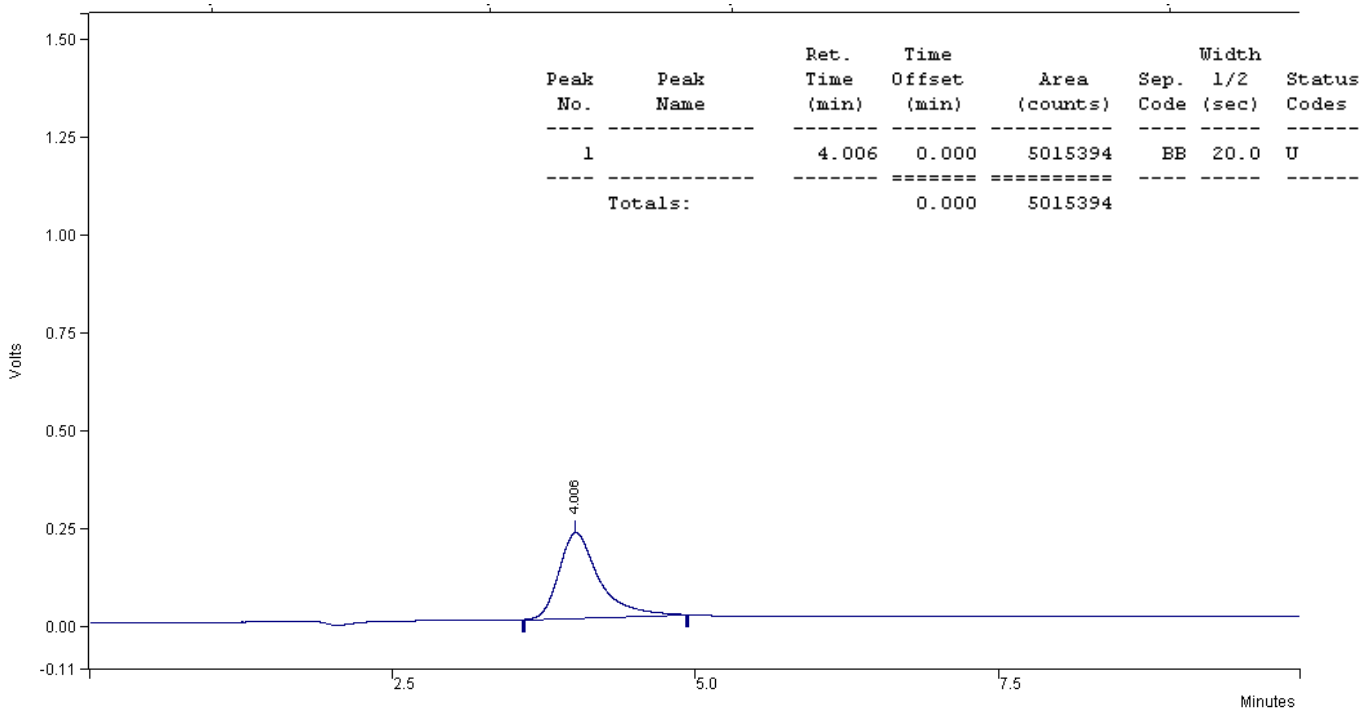
Conjuntamente, os resultados reforçam a hipótese de que a microbiota associada a insetos xilófagos é dotada de potencial biotecnológico que justifica investigação científica com intuito de prospecção.

ANEXOS

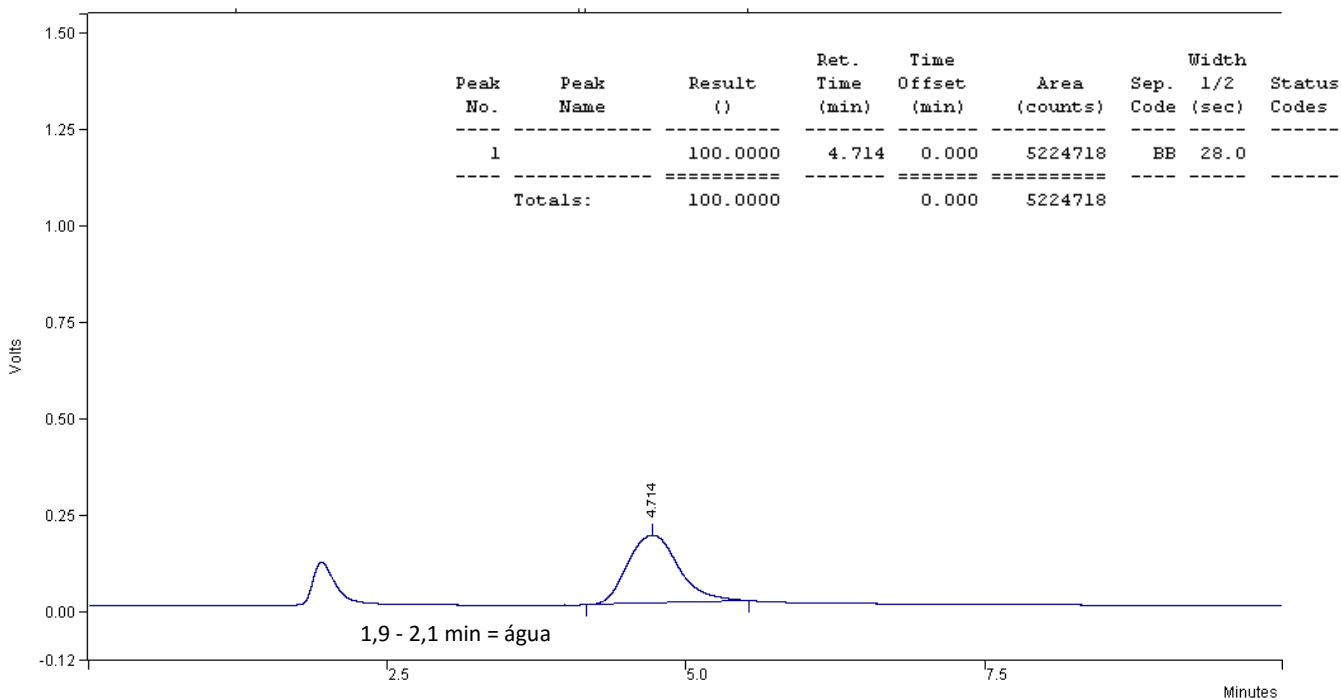
I. Cromatogramas dos ensaios de hidrólise ácida de bagaço de cana de açúcar

CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES:

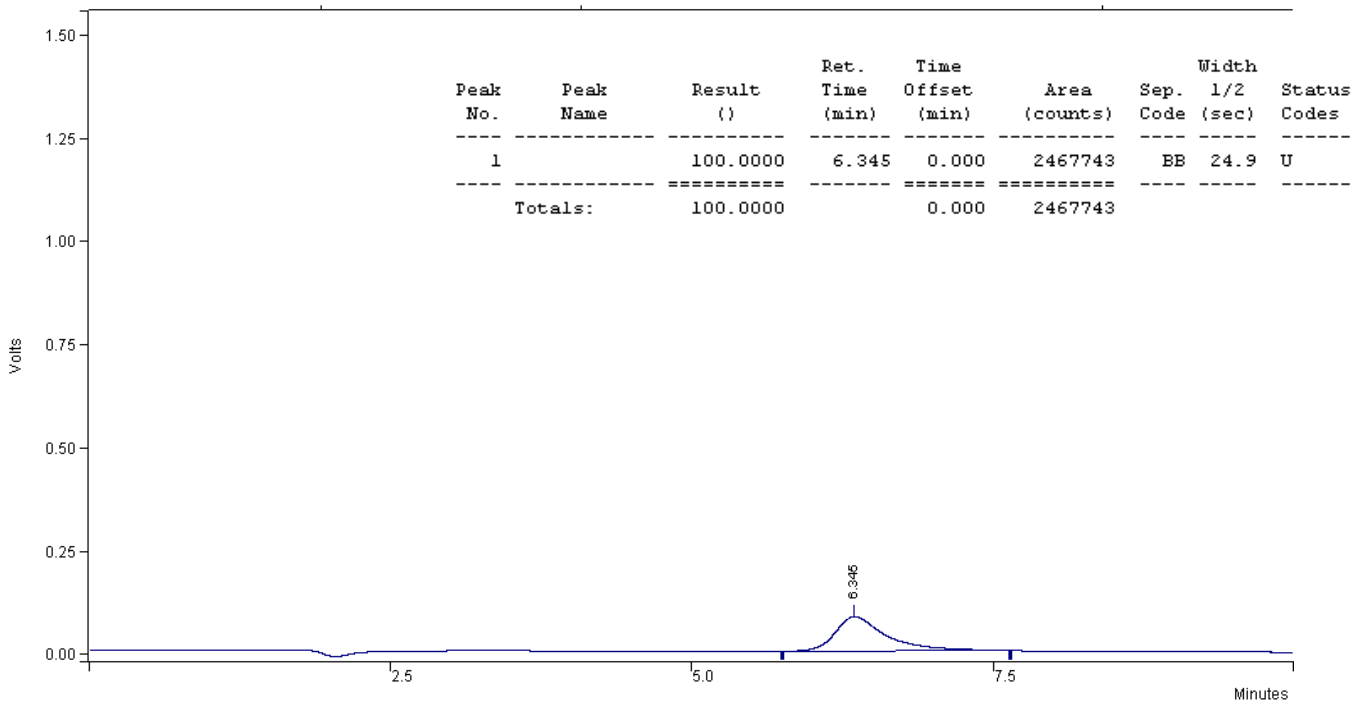
1. Solução padrão (12 mg/mL) de xilose:



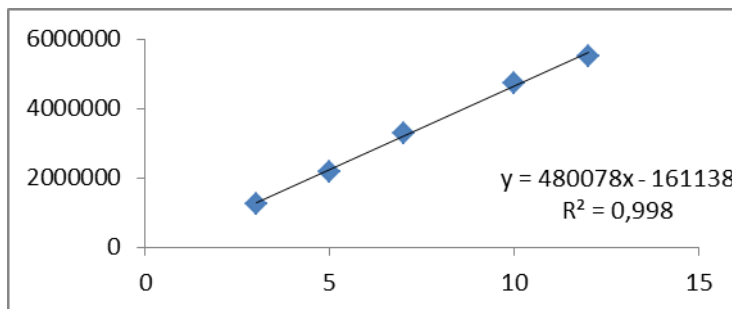
2. Solução padrão (12 mg/mL) de galactose:



3. Solução padrão (5 mg/mL) de sacarose:



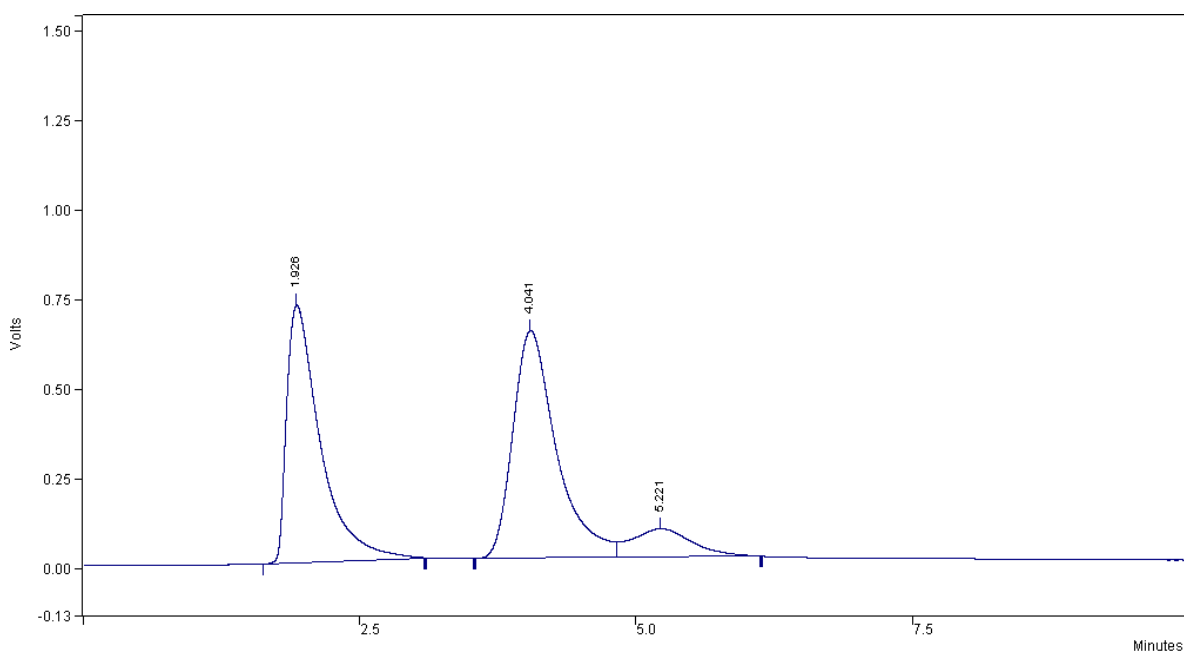
CURVA ANALÍTICA DA GALACTOSE (área X concentração em mg/mL):



CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS:

Amostra 1

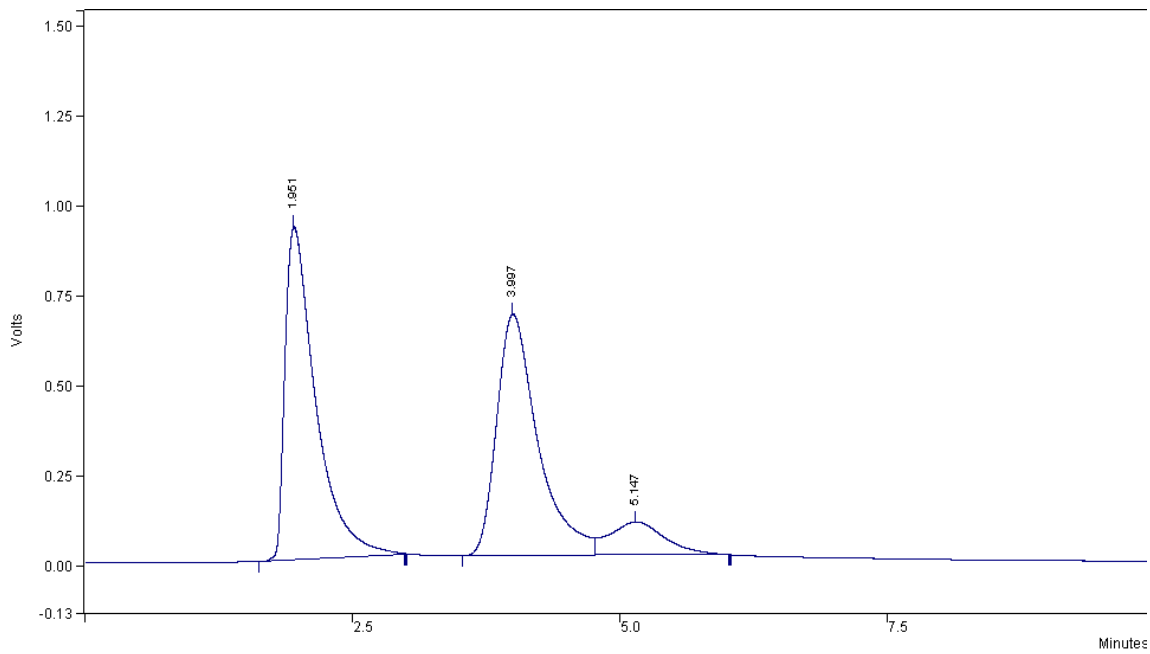
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 1.run
 Method File : amostra 1-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak	Area	Retention (min)	Height (Volts)	Integration	Label	Time (min)	Unit
1	42.7210	1.926	0.000	15252750	BB	18.2	U
2	48.8801	4.041	0.000	17451738	BV	23.8	U
3	8.3989	5.221	0.000	2998675	VB	43.3	U
Totals:		100.0000	0.000	35703163			

Amostra 2

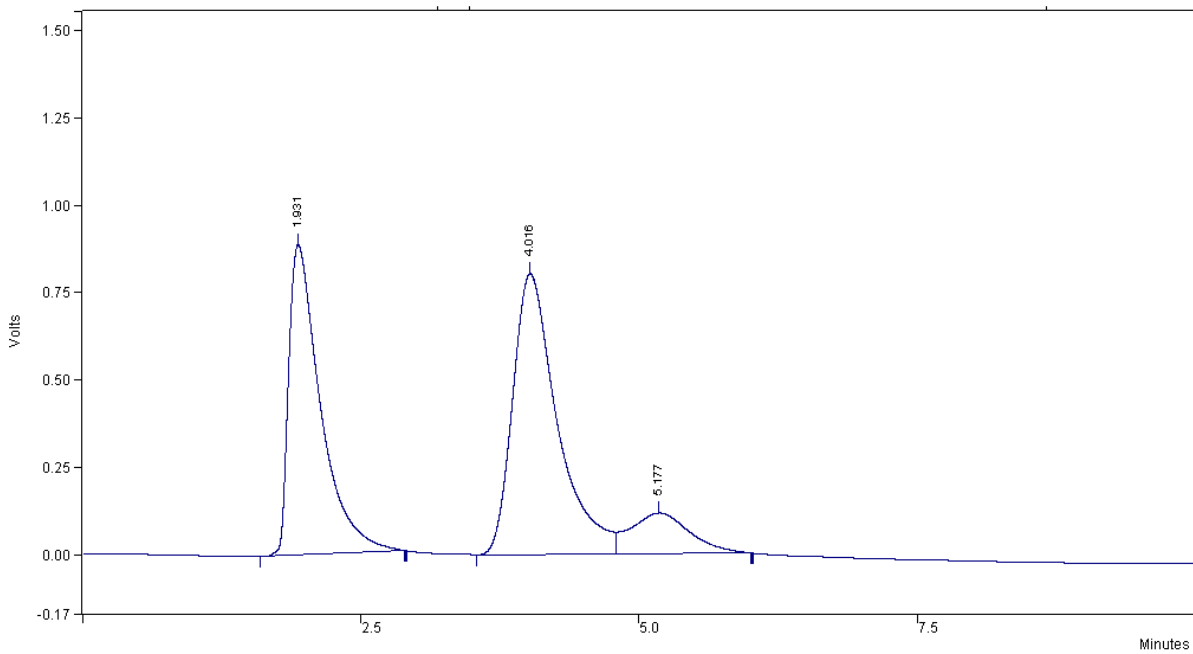
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 2.run
 Method File : amostra 2-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		46.4126	1.951	0.000	18513054	BB	17.3	U
2		45.2375	3.997	0.000	18044350	BV	23.1	U
3		8.3499	5.147	0.000	3330608	VB	40.7	U
Totals:		100.0000		0.000	39888012			

Amostra 3

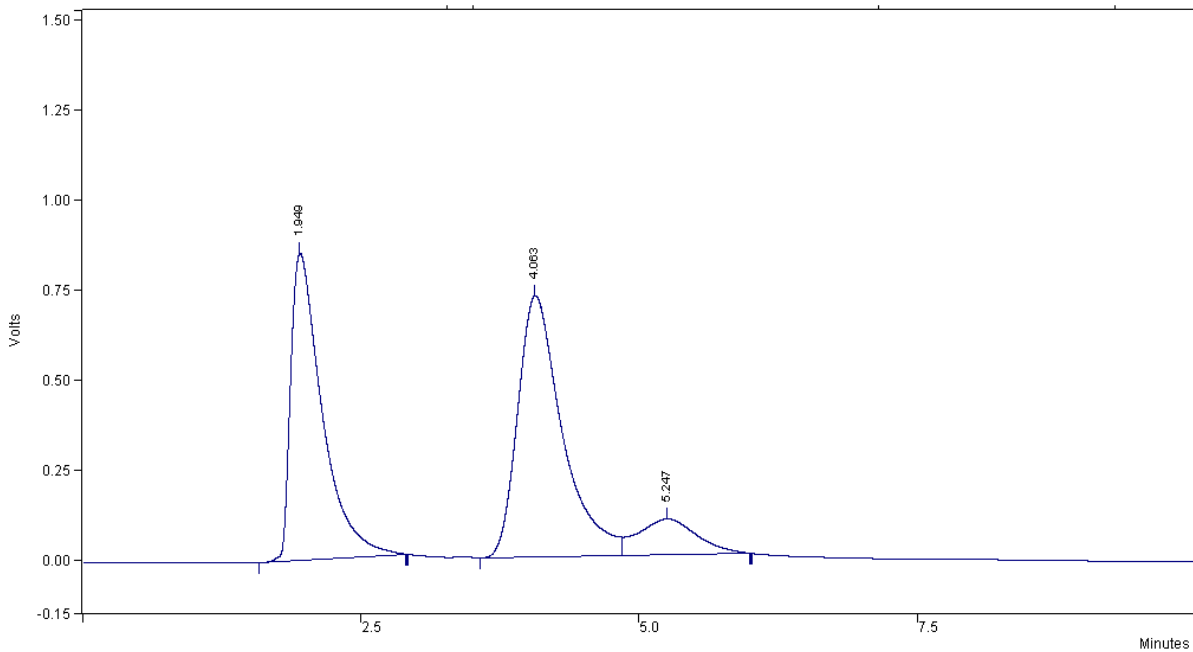
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 3.run
 Method File : amostra 3-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		37.0087	2.024	0.000	2554525	BB	12.4	U
2		52.6689	4.045	0.000	3635466	BV	19.7	U
3		10.3224	5.239	0.000	712502	VB	34.8	U
Totals:		100.0000		0.000	6902493			

Amostra 4

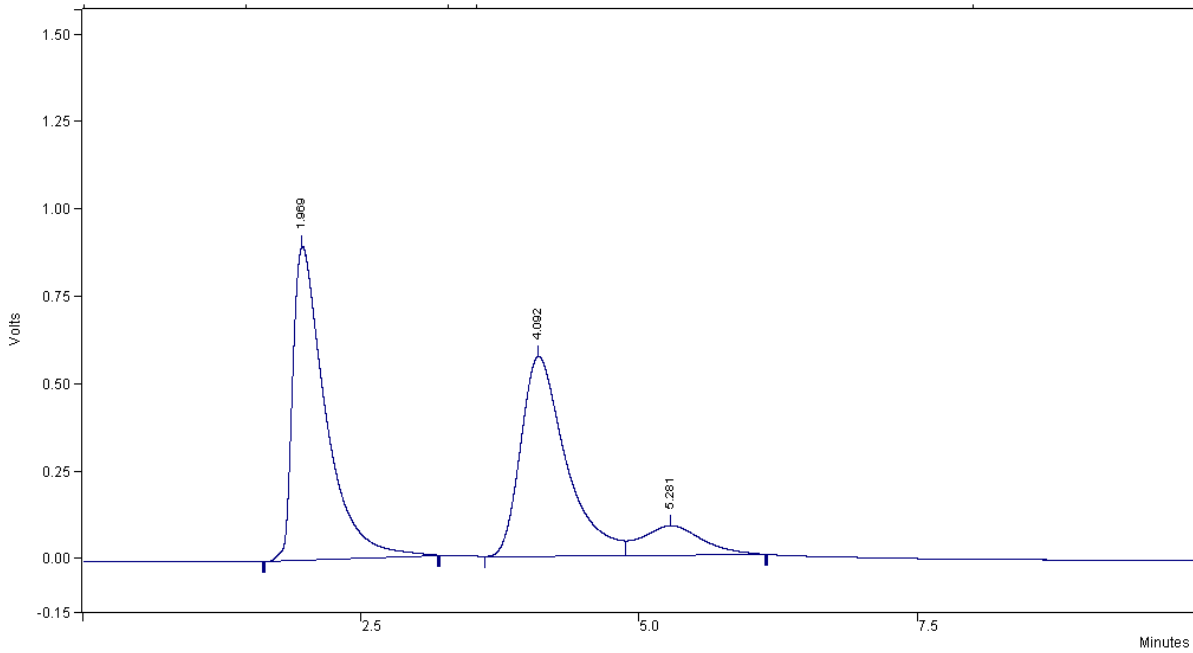
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 4.run
 Method File : amostra 4-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		41.2444	1.949	0.000	16770166	BB	17.3	U
2		49.8248	4.063	0.000	20259010	BV	24.2	U
3		8.9309	5.247	0.000	3631331	VB	43.7	U
Totals:		100.0001		0.000	40660507			

Amostra 5

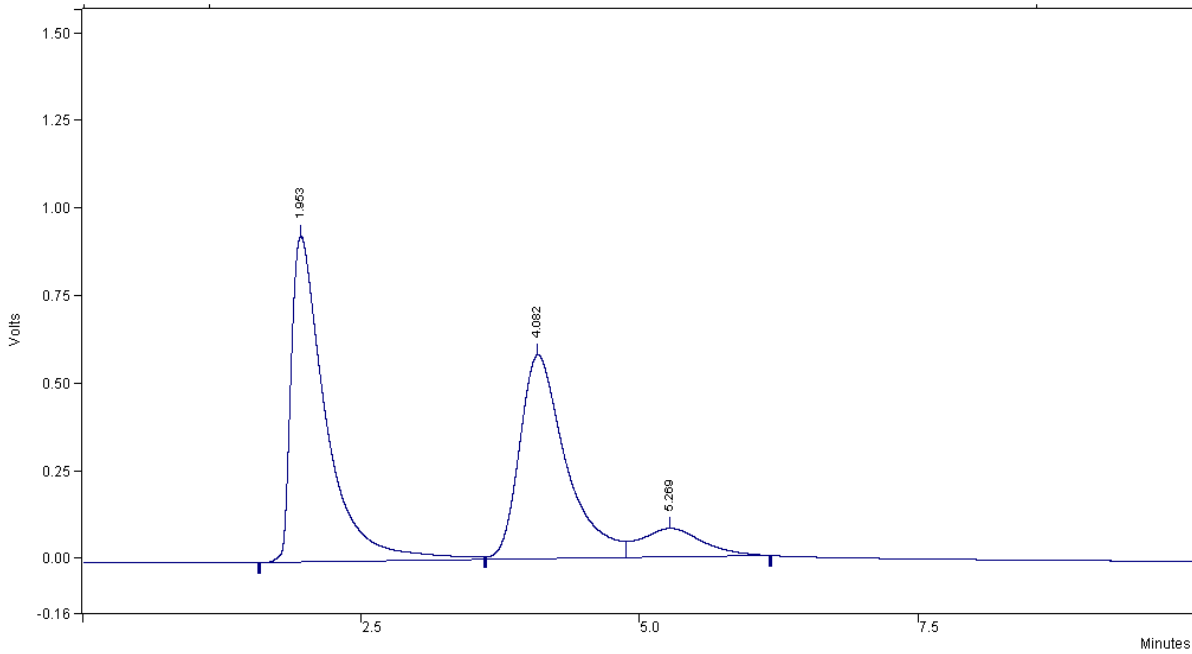
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 5.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		48.7214	1.969	0.000	18417526	BB	17.7	U
2		42.8594	4.092	0.000	16201583	BV	24.7	U
3		8.4193	5.281	0.000	3182633	VB	42.9	U
Totals:		100.0001		0.000	37801742			

Amostra 6

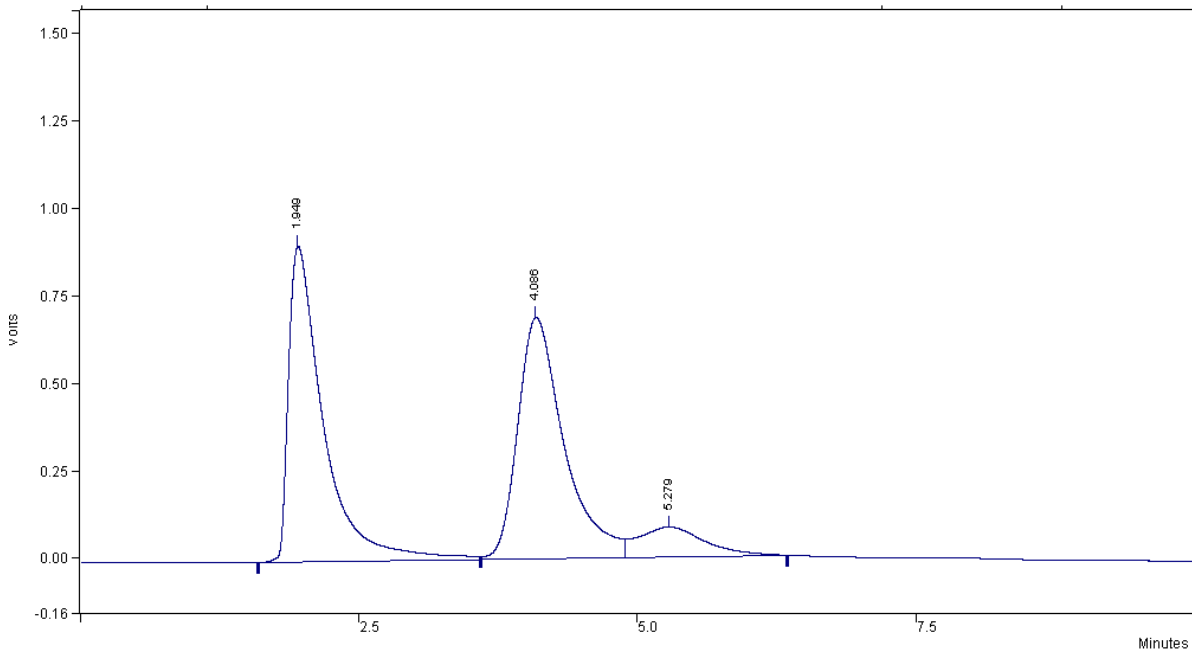
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 6.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		50.1752	1.953	0.000	20197462	BV	17.9	U
2		41.9495	4.082	0.000	16886278	VV	25.9	U
3		7.8753	5.269	0.000	3170106	VB	52.1	U
Totals:		100.0000		0.000	40253846			

Amostra 7

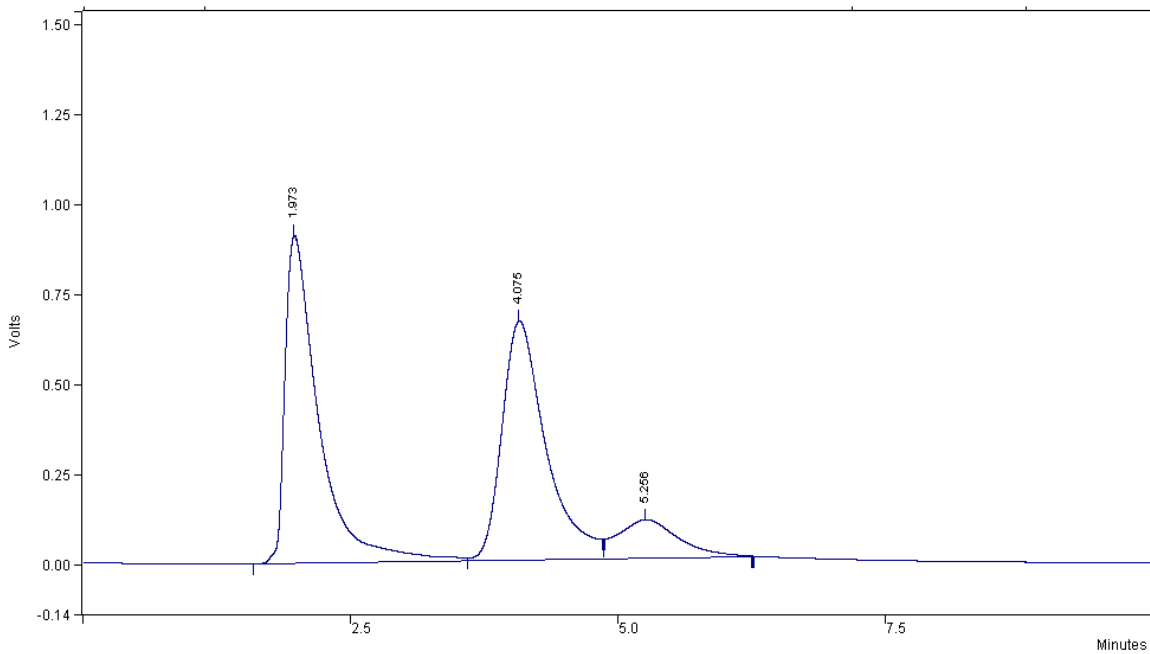
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 7.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		45.5986	1.949	0.000	19724736	BV	17.9	U
2		46.1976	4.086	0.000	19983828	VV	25.7	U
3		8.2038	5.279	0.000	3548728	VB	56.7	U
Totals:		100.0000		0.000	43257292			

Amostra 8

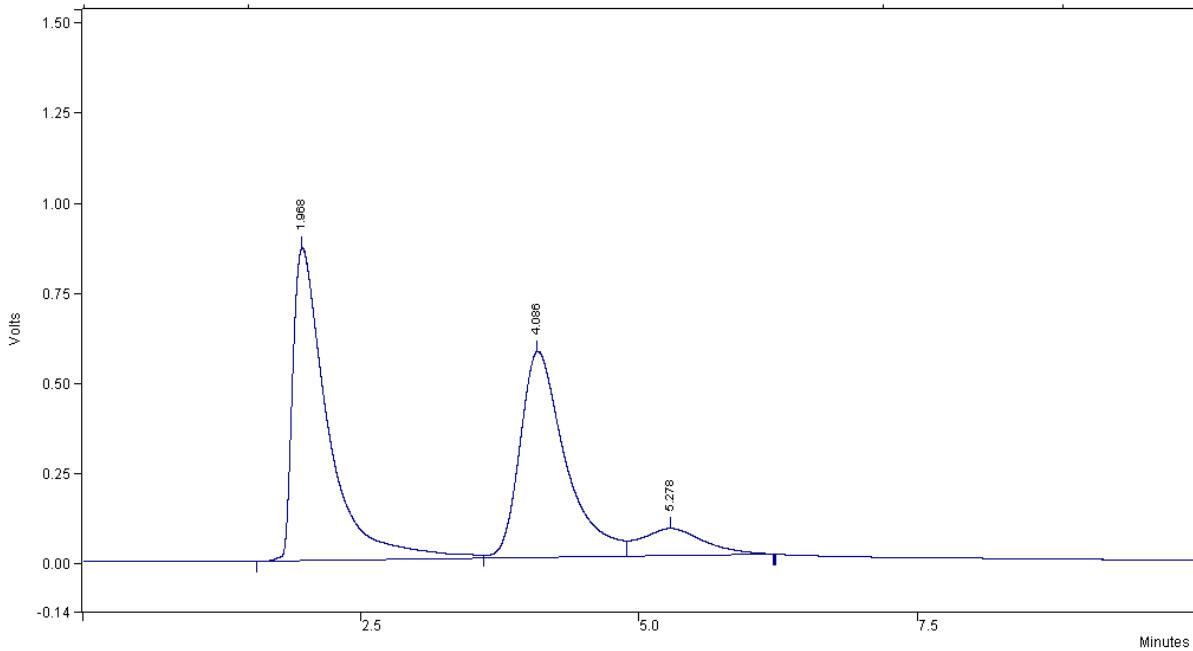
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 8.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		46.3619	1.973	0.000	19928264	BV	17.9	U
2		44.0626	4.075	0.000	18939928	VV	25.4	U
3		9.5755	5.256	0.000	4115930	VB	49.2	U
Totals:		100.0000		0.000	42984122			

Amostra 9

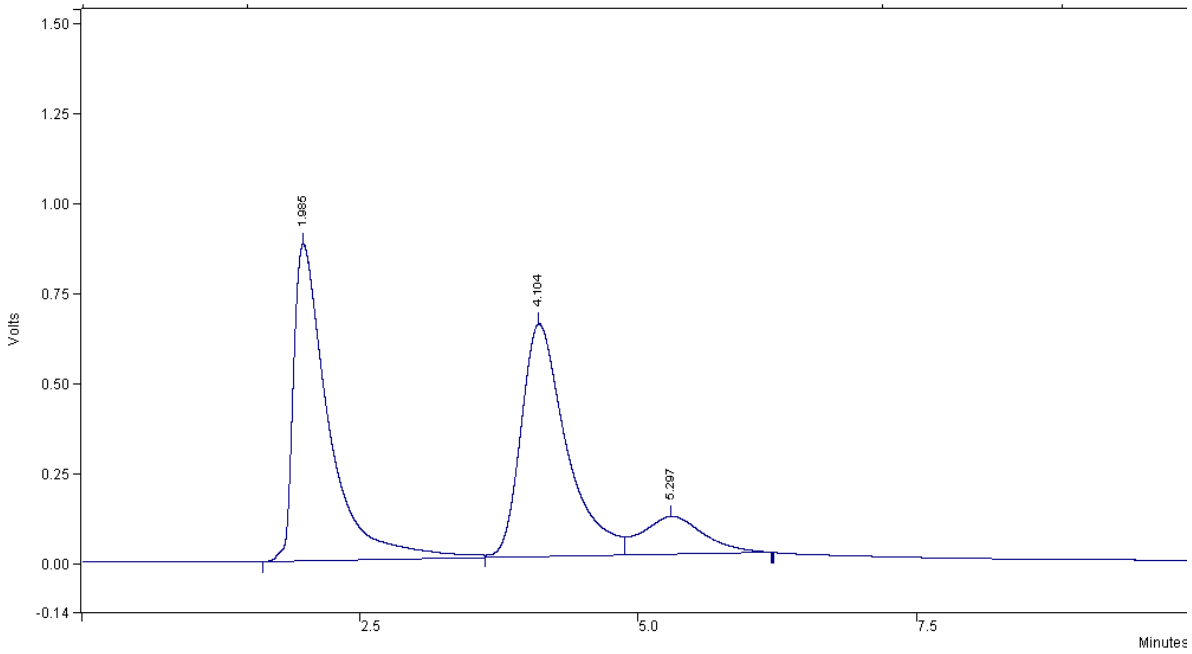
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 9.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		49.8358	1.968	0.000	19118770	BV	17.8	U
2		42.4156	4.086	0.000	16272108	VV	25.1	U
3		7.7486	5.278	0.000	2972622	VB	53.7	U
Totals:		100.0000		0.000	38363500			

Amostra 10

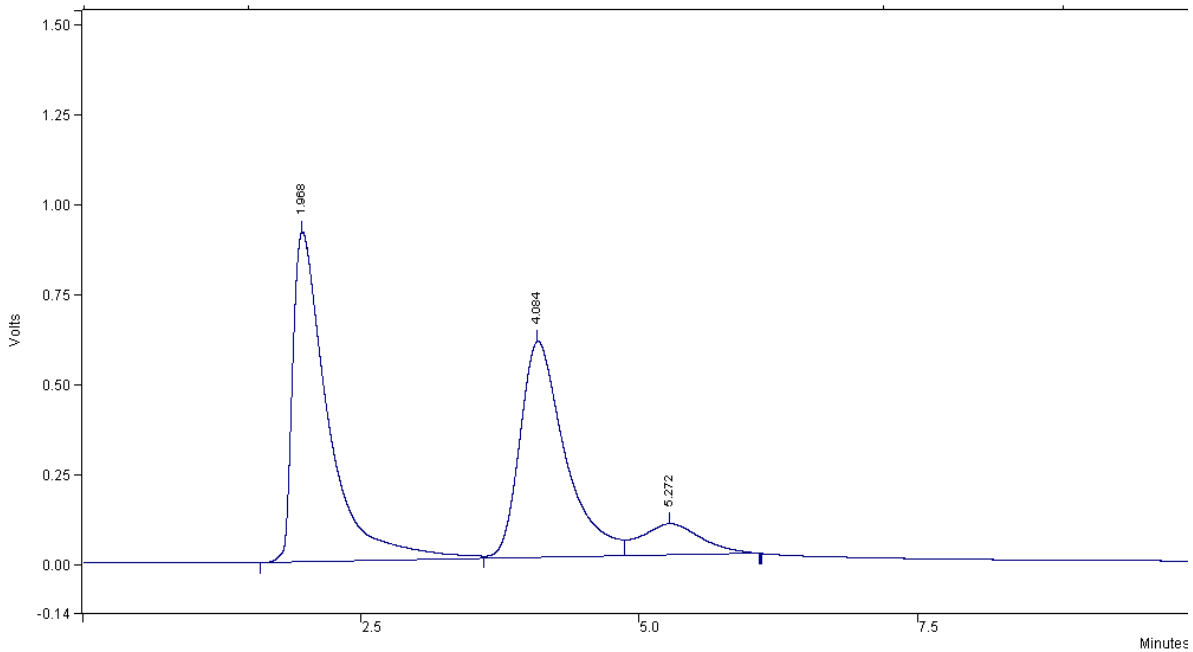
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 10.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		46.4599	1.985	0.000	19436404	BV	17.9	U
2		43.8837	4.104	0.000	18358688	VV	25.4	U
3		9.6564	5.297	0.000	4039745	VB	49.0	U
Totals:		100.0000		0.000	41834837			

Amostra 11

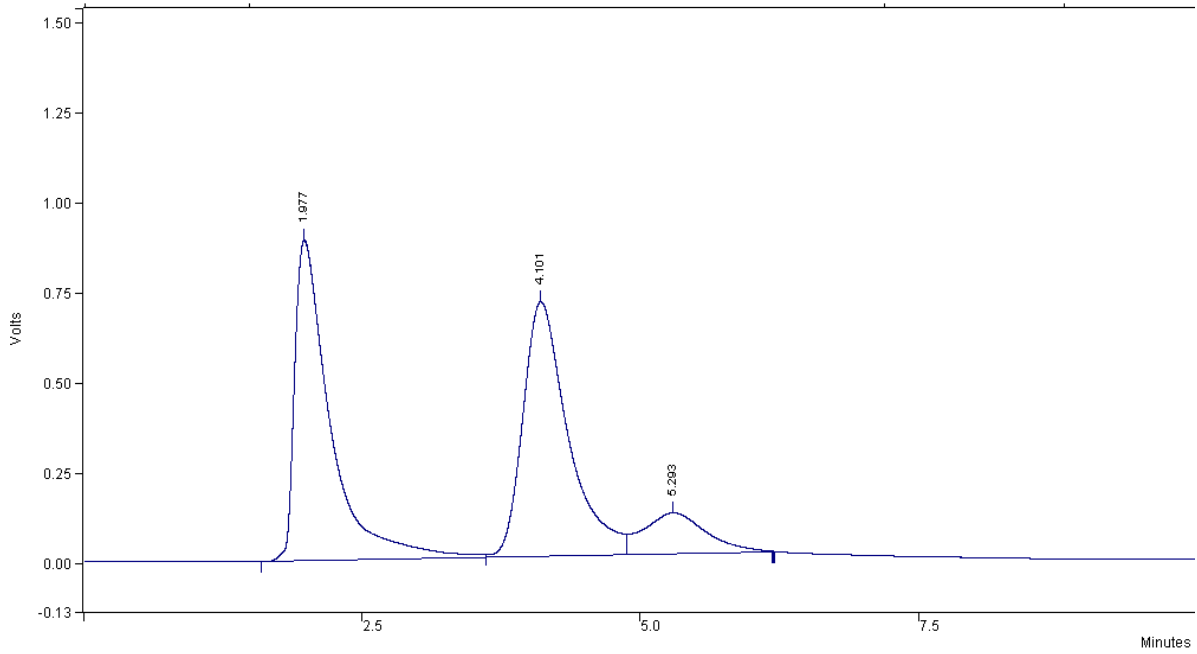
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 11.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		50.0488	1.968	0.000	20339718	BV	18.0	U
2		41.8567	4.084	0.000	17010484	VV	25.4	U
3		8.0945	5.272	0.000	3289581	VB	51.0	U
Totals:		100.0000		0.000	40639783			

Amostra 12

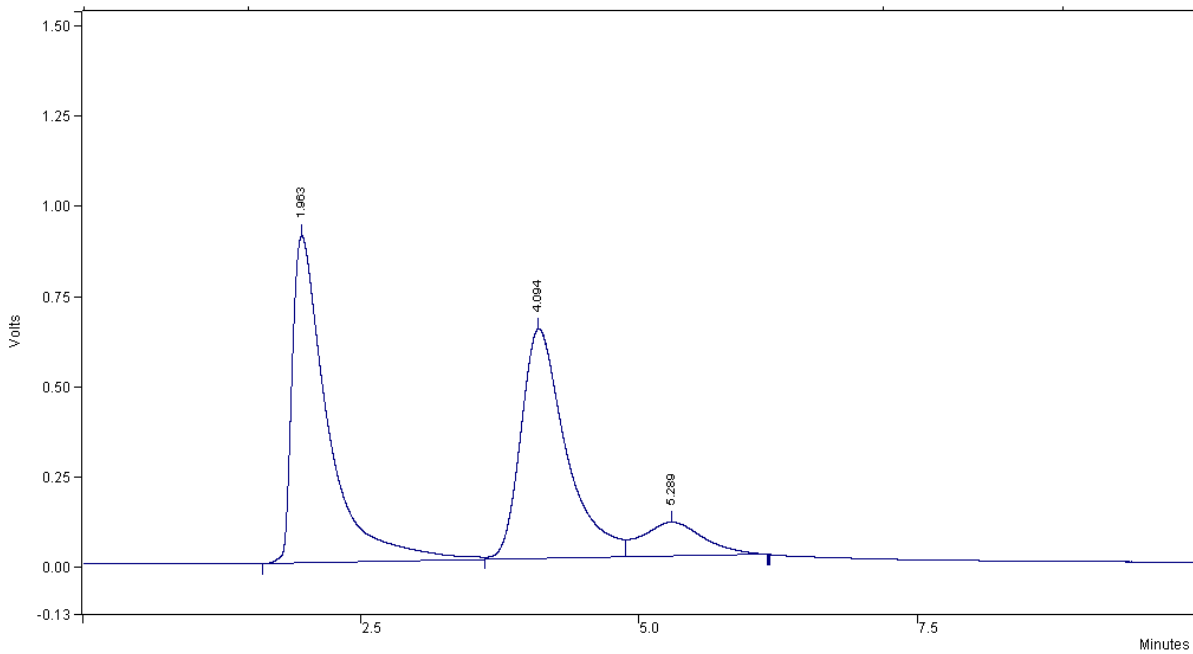
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 12.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		44.9094	1.977	0.000	19788288	BV	17.9	U
2		45.2230	4.101	0.000	19926500	VV	25.2	U
3		9.8676	5.293	0.000	4347935	VB	50.2	U
Totals:		100.0000		0.000	44062723			

Amostra 13

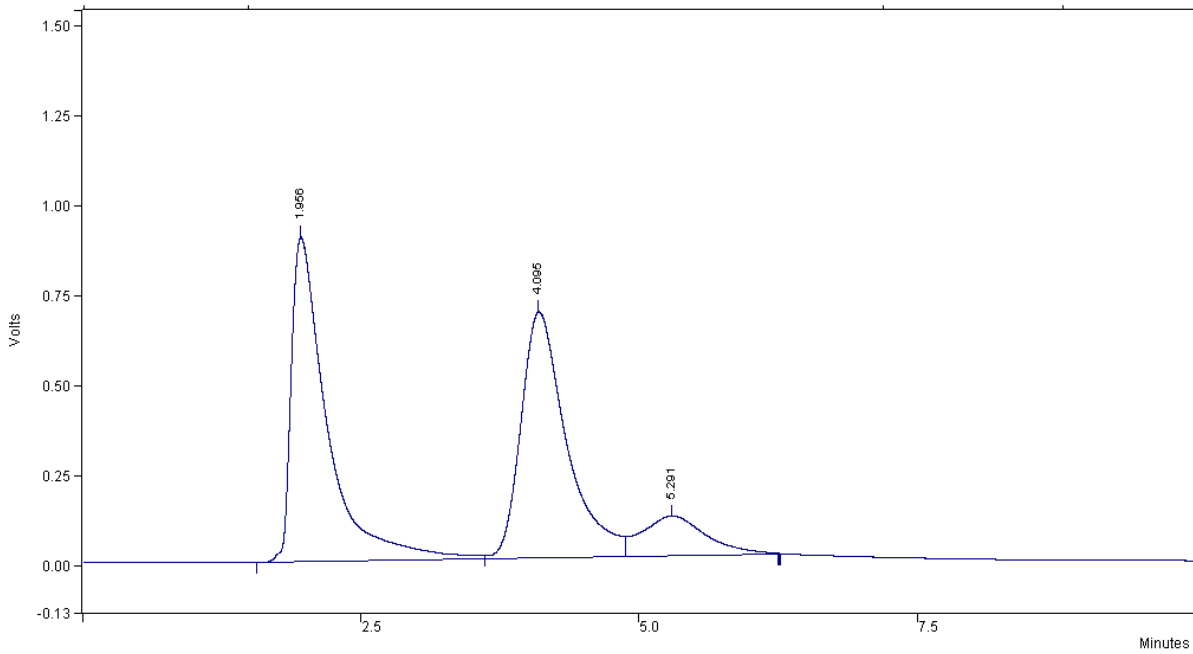
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 13.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		48.2794	1.963	0.000	20258928	BV	17.9	U
2		43.0194	4.094	0.000	18051718	VV	25.1	U
3		8.7012	5.289	0.000	3651162	VB	51.1	U
Totals:		100.0000		0.000	41961808			

Amostra 14

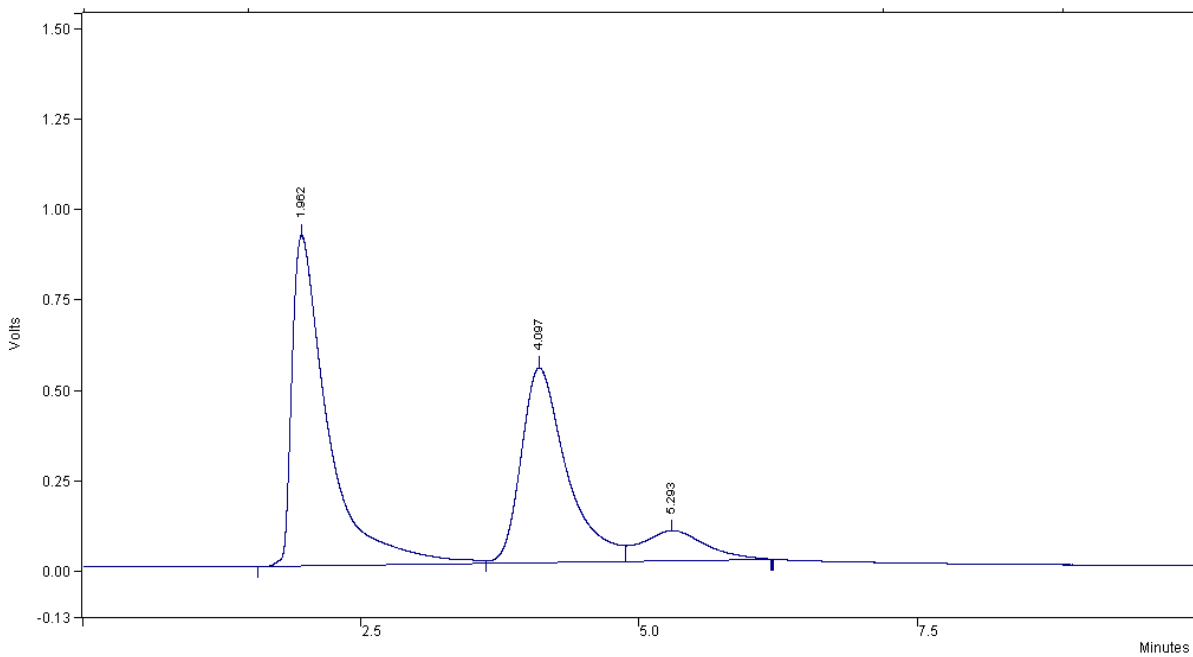
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 14.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		46.0093	1.956	0.000	20184354	BV	17.9	U
2		44.1438	4.095	0.000	19365954	VV	25.2	U
3		9.8470	5.291	0.000	4319881	VB	50.0	U
Totals:		100.0001		0.000	43870189			

Amostra 16

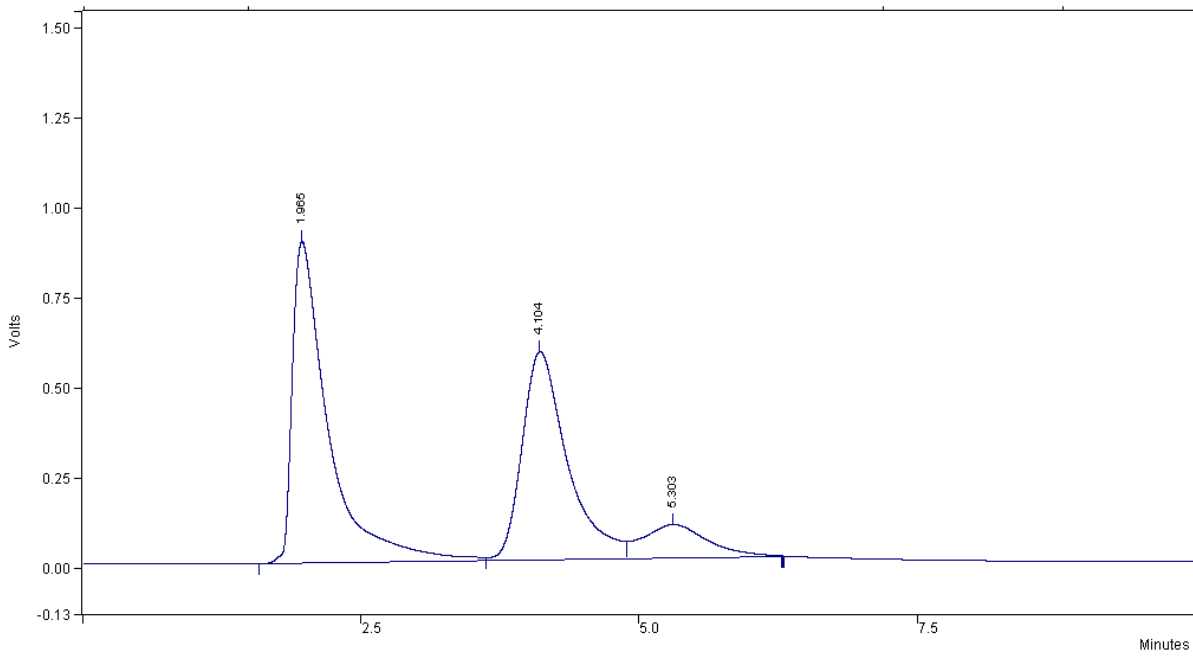
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 16.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		52.5052	1.962	0.000	20597108	BV	17.9	U
2		39.1685	4.097	0.000	15365280	VV	25.3	U
3		8.3263	5.293	0.000	3266314	VB	51.3	U
Totals:		100.0000		0.000	39228702			

Amostra 17

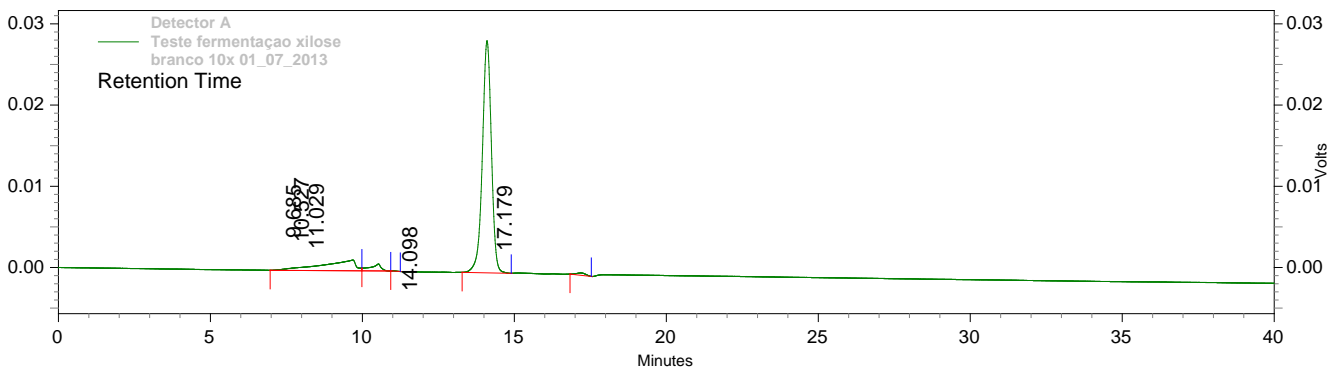
Run File : c:\star\data\sugars_italo\amostra 17.run
 Method File : amostra 5-1.mth
 Sample ID : Manual Sample



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		49.9795	1.965	0.000	20043364	BV	17.7	U
2		40.8058	4.104	0.000	16364390	VV	25.1	U
3		9.2147	5.303	0.000	3695391	VB	51.0	U
Totals:		100.0000		0.000	40103145			

II. Cromatogramas do teste de fermentação de D-xilose a etanol e xilitol

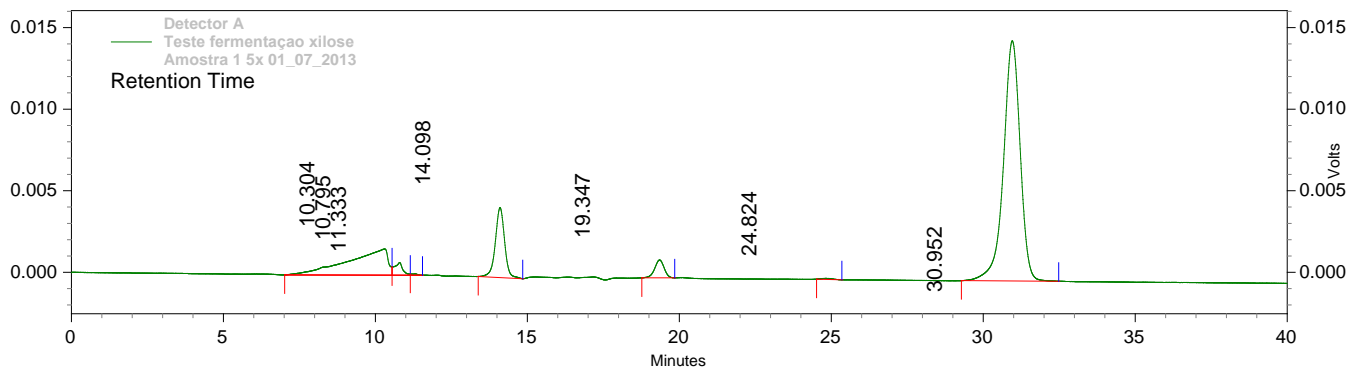
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\branco 10x 01_07_2013
 Acquired: 7/1/2013 11:52:05 AM
 Printed: 7/10/2013 10:01:41 AM



Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	9.685	101972	14.167	1320	4.255
2	10.527	20874	2.900	848	2.734
3	11.029	257	0.036	35	0.111
4	14.098	590645	82.057	28526	91.980
5	17.179	6050	0.840	285	0.919
Totals		719798	100.000	31013	100.000

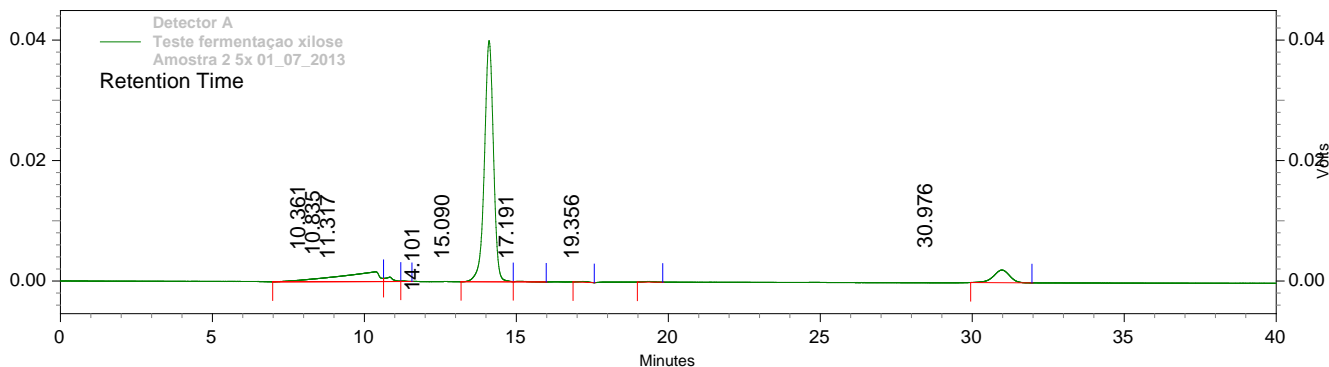
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 1 5x 01_07_2013
 Acquired: 7/1/2013 1:21:48 PM
 Printed: 7/10/2013 10:03:56 AM



Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.304	146497	17.434	1604	7.099
2	10.795	14583	1.735	775	3.428
3	11.333	1074	0.128	77	0.340
4	14.098	90786	10.804	4281	18.947
5	19.347	23464	2.792	1091	4.828
6	24.824	1456	0.173	60	0.267
7	30.952	562447	66.934	14708	65.090
Totals		840307	100.000	22597	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 2 5x 01_07_2013
 Acquired: 7/1/2013 2:03:41 PM
 Printed: 7/10/2013 10:04:59 AM

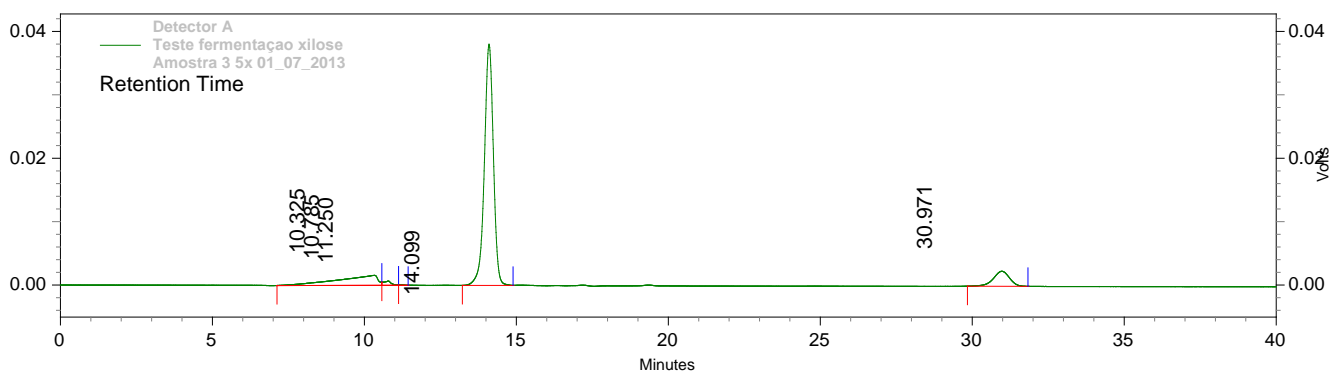


Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.361	151964	14.109	1614	3.609
2	10.835	12718	1.181	727	1.625
3	11.317	814	0.076	73	0.163
4	14.101	827039	76.786	39922	89.243
5	15.090	2816	0.261	81	0.180
6	17.191	2330	0.216	116	0.259
7	19.356	2171	0.202	103	0.230
8	30.976	77221	7.170	2098	4.691

Totals		1077073	100.000	44734	100.000
--------	--	---------	---------	-------	---------

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 3 5x 01_07_2013
 Acquired: 7/1/2013 2:45:23 PM
 Printed: 7/10/2013 10:06:54 AM

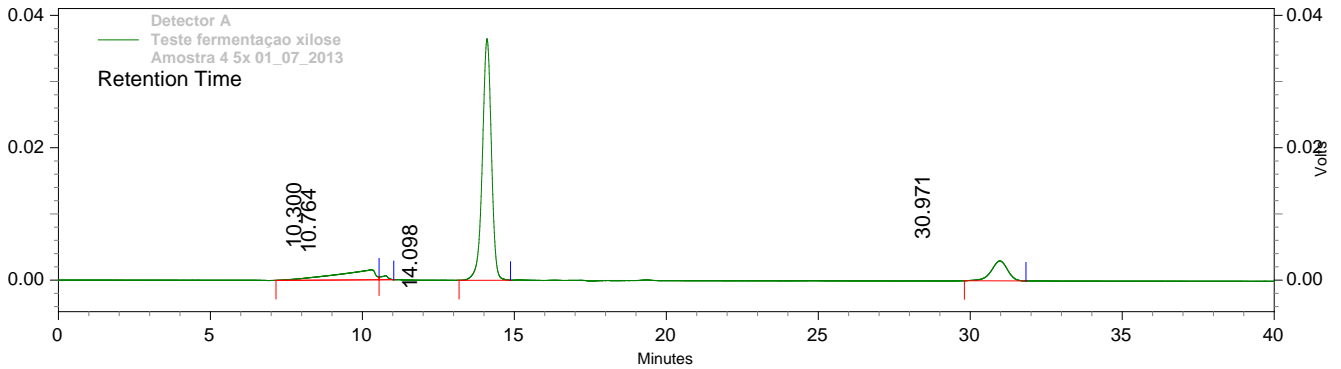


Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.325	143828	13.970	1572	3.681
2	10.785	11786	1.145	675	1.581
3	11.250	686	0.067	61	0.142
4	14.099	785377	76.283	38039	89.048
5	30.971	87887	8.536	2370	5.548

Totals		1029564	100.000	42717	100.000
--------	--	---------	---------	-------	---------

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 4 5x 01_07_2013
 Acquired: 7/1/2013 3:29:14 PM
 Printed: 7/10/2013 10:07:30 AM

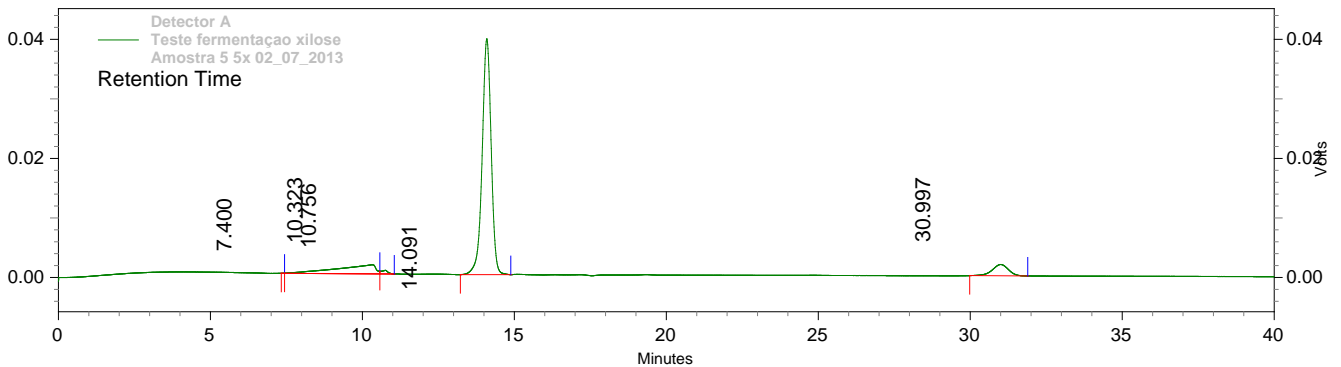


Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.300	134140	13.309	1503	3.612
2	10.764	9841	0.976	609	1.463
3	14.098	752602	74.672	36487	87.713
4	30.971	111296	11.043	3000	7.212

Totals		1007879	100.000	41598	100.000
--------	--	---------	---------	-------	---------

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 5 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 8:35:48 AM
 Printed: 7/10/2013 10:08:49 AM

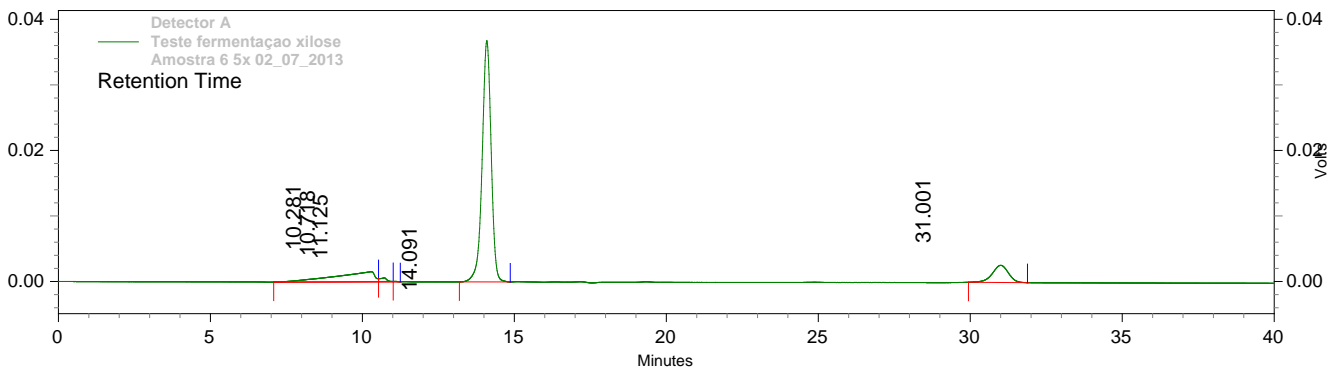


Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	7.400	71	0.007	17	0.038
2	10.323	133904	13.005	1521	3.487
3	10.756	8936	0.868	598	1.372
4	14.091	816785	79.327	39589	90.752
5	30.997	69952	6.794	1898	4.350

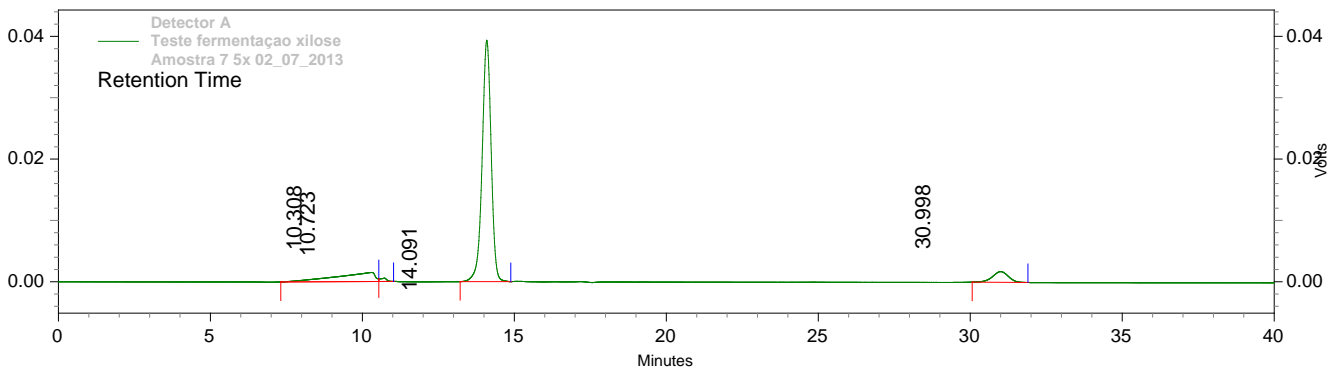
Totals		1029649	100.000	43623	100.000
--------	--	---------	---------	-------	---------

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 6 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 9:17:34 AM
 Printed: 7/10/2013 10:09:22 AM



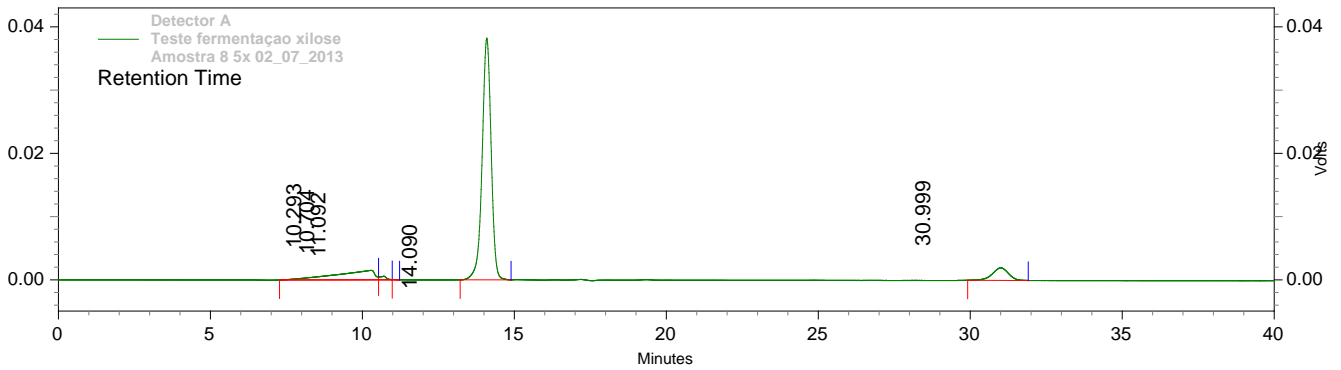
Detector A						
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
1	10.281	139410	13.860	1536	3.695	
2	10.718	9600	0.954	599	1.441	
3	11.125	406	0.040	43	0.104	
4	14.091	760116	75.571	36785	88.471	
5	31.001	96296	9.574	2614	6.288	
Totals		1005827	100.000	41578	100.000	

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 7 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 9:59:17 AM
 Printed: 7/10/2013 10:10:03 AM



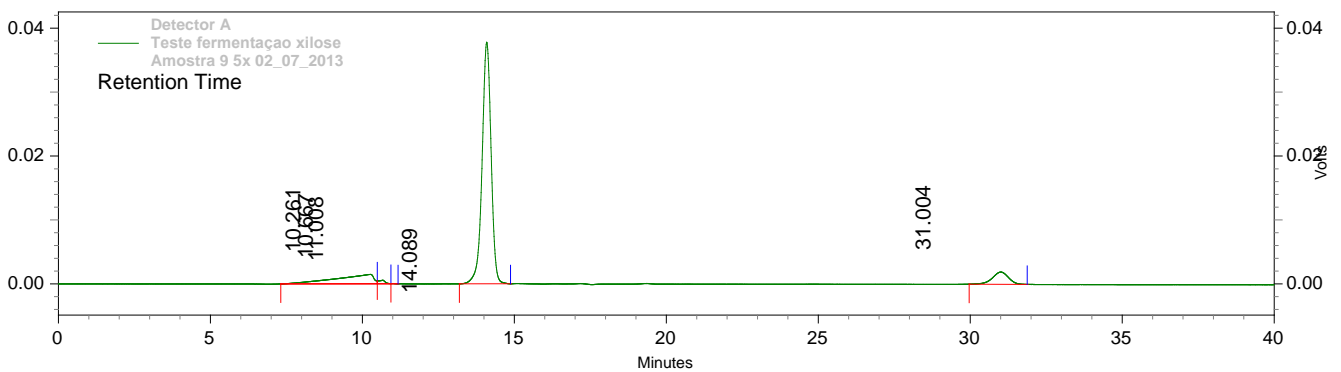
Detector A						
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
1	10.308	130861	12.886	1482	3.438	
2	10.723	8002	0.788	535	1.242	
3	14.091	813062	80.063	39336	91.259	
4	30.998	63603	6.263	1750	4.060	
Totals		1015528	100.000	43103	100.000	

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 8 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 10:41:02 AM
 Printed: 7/10/2013 10:10:28 AM



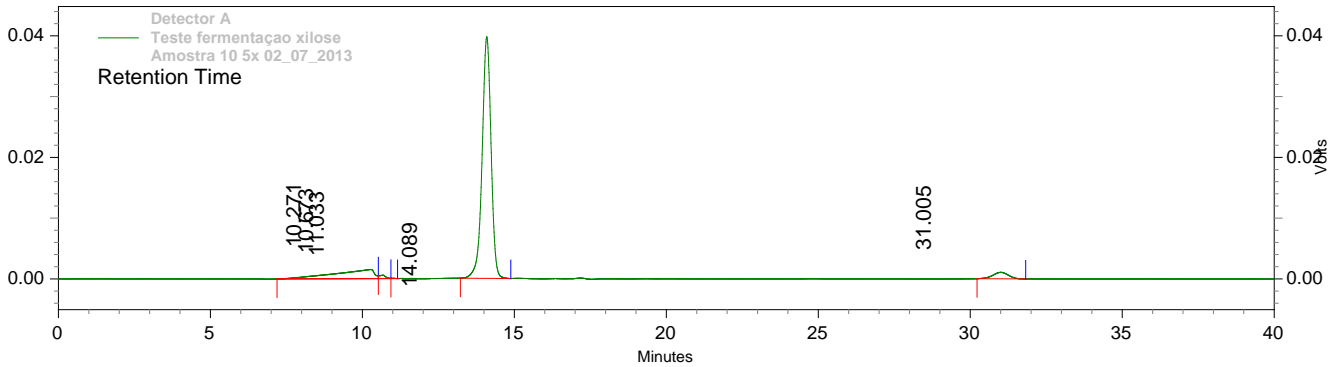
Detector A						
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
1	10.293	132396	13.206	1497	3.542	
2	10.704	8569	0.855	564	1.334	
3	11.092	334	0.033	34	0.080	
4	14.090	788122	78.612	38202	90.372	
5	30.999	73128	7.294	1975	4.672	
Totals		1002548	100.000	42272	100.000	

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 9 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 11:22:48 AM
 Printed: 7/10/2013 10:10:55 AM



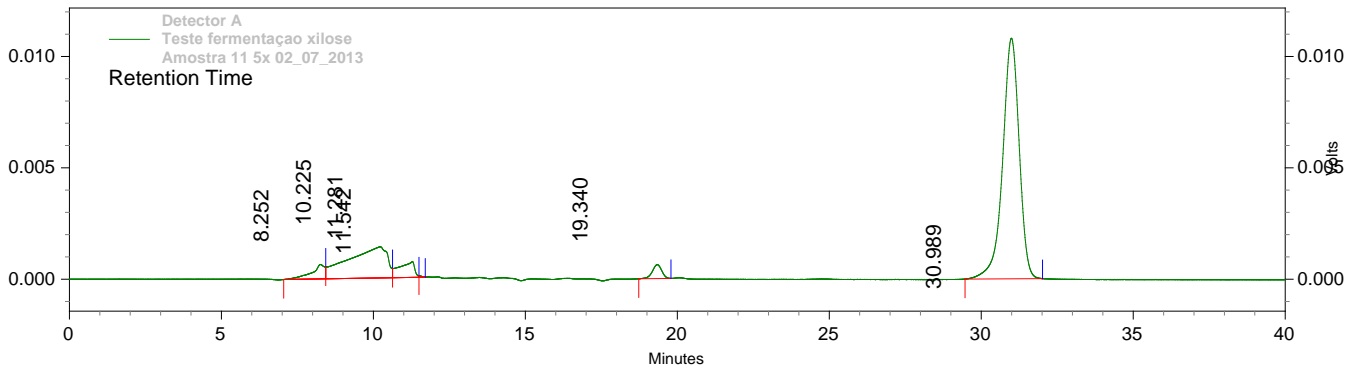
Detector A						
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
1	10.261	127052	12.894	1468	3.514	
2	10.667	8346	0.847	552	1.322	
3	11.008	297	0.030	39	0.092	
4	14.089	778883	79.047	37789	90.480	
5	31.004	70758	7.181	1917	4.591	
Totals		985336	100.000	41764	100.000	

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 10 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 12:46:15 PM
 Printed: 7/10/2013 10:11:15 AM



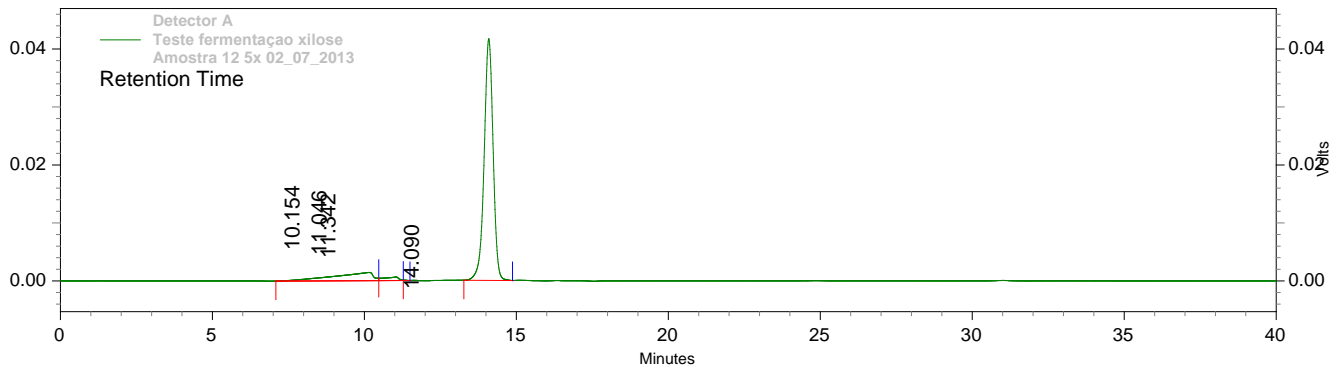
Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.271	137063	13.706	1509	3.515
2	10.673	8271	0.827	564	1.313
3	11.033	408	0.041	49	0.115
4	14.089	816560	81.653	39748	92.584
5	31.005	37729	3.773	1061	2.472
Totals		1000031	100.000	42932	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 11 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 1:27:55 PM
 Printed: 7/10/2013 10:11:59 AM



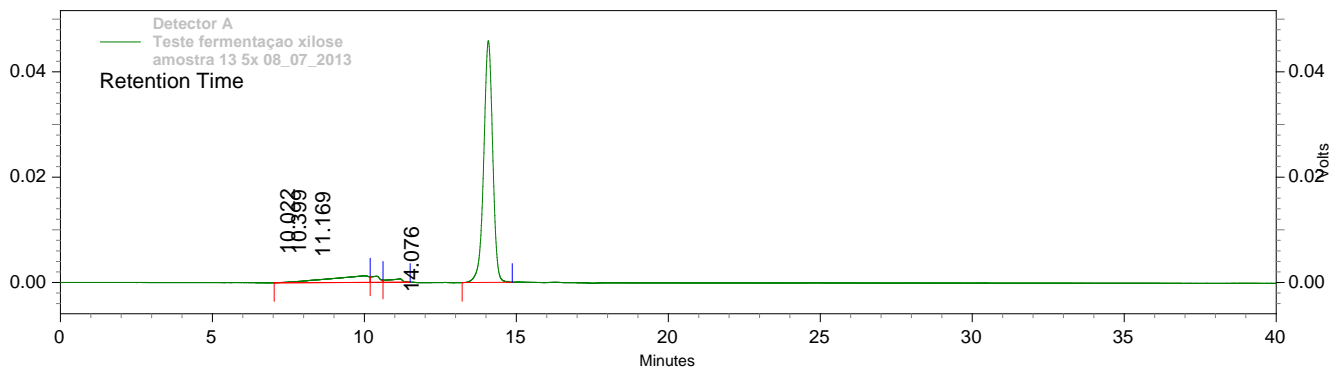
Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.252	19821	3.351	648	4.549
2	10.225	124825	21.106	1397	9.808
3	11.281	24538	4.149	711	4.992
4	11.542	367	0.062	62	0.434
5	19.340	13446	2.273	627	4.402
6	30.989	408432	69.058	10797	75.814
Totals		591430	100.000	14242	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Amostra 12 5x 02_07_2013
 Acquired: 7/2/2013 2:52:59 PM
 Printed: 7/10/2013 10:13:14 AM



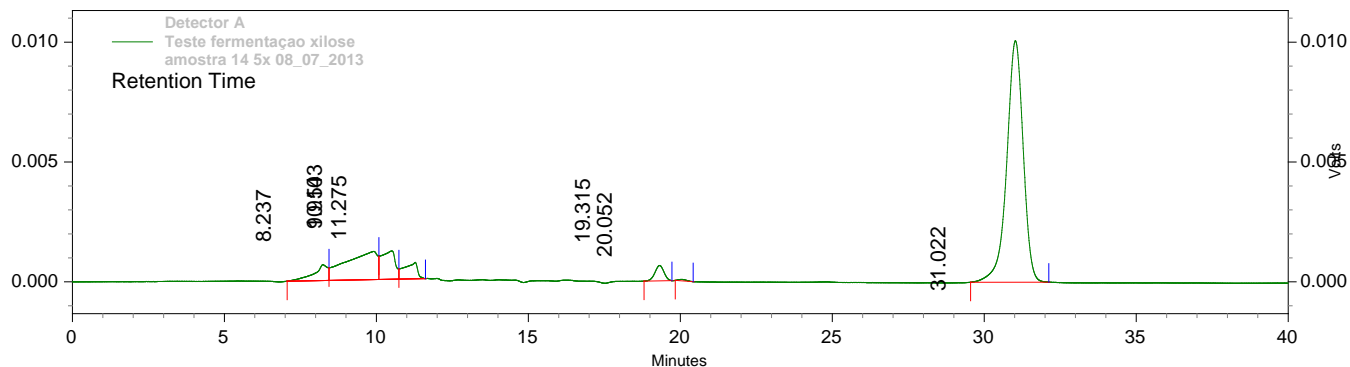
Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.154	127559	12.714	1419	3.243
2	11.046	20434	2.037	616	1.407
3	11.342	386	0.039	53	0.122
4	14.090	854905	85.211	41664	95.228
Totals		1003285	100.000	43751	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 13 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 10:06:35 AM
 Printed: 7/10/2013 10:14:36 AM



Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	10.022	113837	10.358	1254	2.562
2	10.399	23308	2.121	1155	2.359
3	11.169	20524	1.868	667	1.363
4	14.076	941315	85.653	45868	93.715
Totals		1098984	100.000	48944	100.000

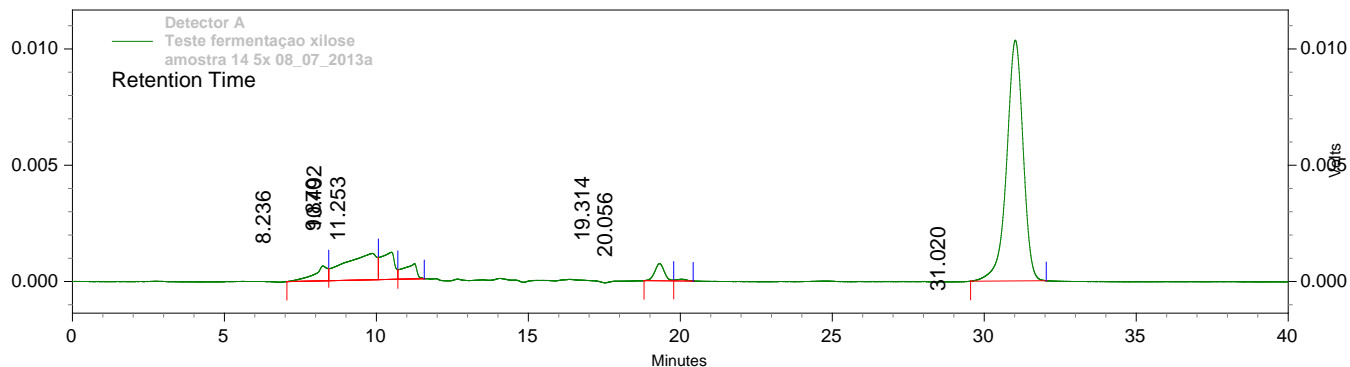
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 14 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 10:48:23 AM
 Printed: 7/10/2013 10:15:20 AM



Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.237	21235	3.802	664	4.594
2	9.914	85250	15.262	1172	8.103
3	10.503	37583	6.728	1176	8.129
4	11.275	20763	3.717	681	4.710
5	19.315	13247	2.372	639	4.417
6	20.052	1065	0.191	60	0.413
7	31.022	379449	67.929	10071	69.634
Totals		558594	100.000	14463	100.000

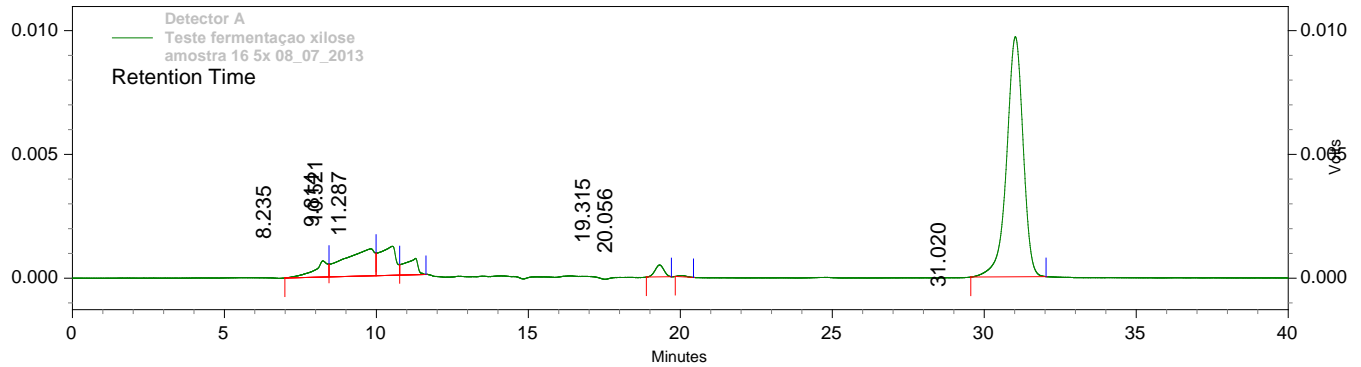
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 15 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 11:55:24 AM
 Printed: 7/10/2013 10:16:18 AM



Detector A

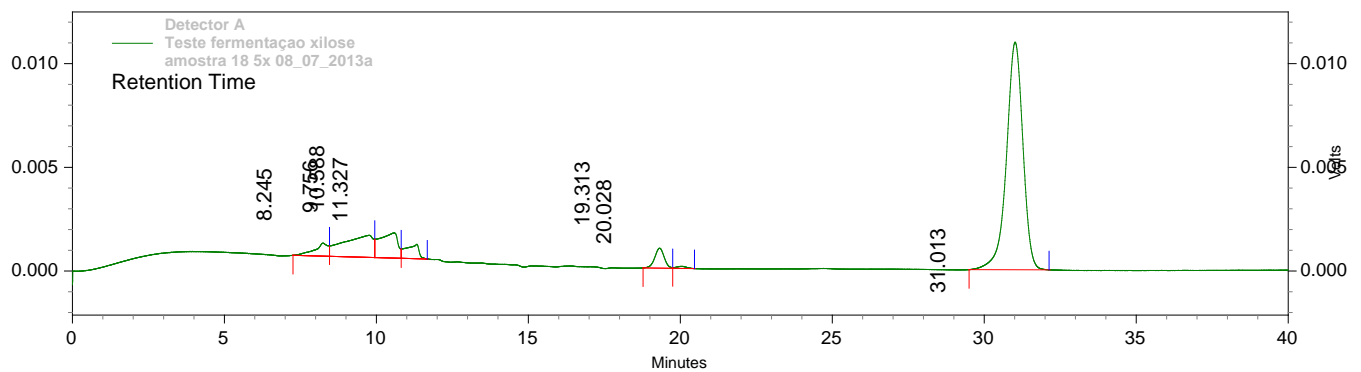
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.236	20075	3.540	638	4.331
2	9.870	83548	14.732	1132	7.676
3	10.492	36290	6.399	1163	7.890
4	11.253	20299	3.579	654	4.436
5	19.314	15865	2.797	737	4.998
6	20.056	1573	0.277	72	0.485
7	31.020	389487	68.676	10346	70.183
Totals		567136	100.000	14741	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 16 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 12:38:58 PM
 Printed: 7/10/2013 10:16:45 AM



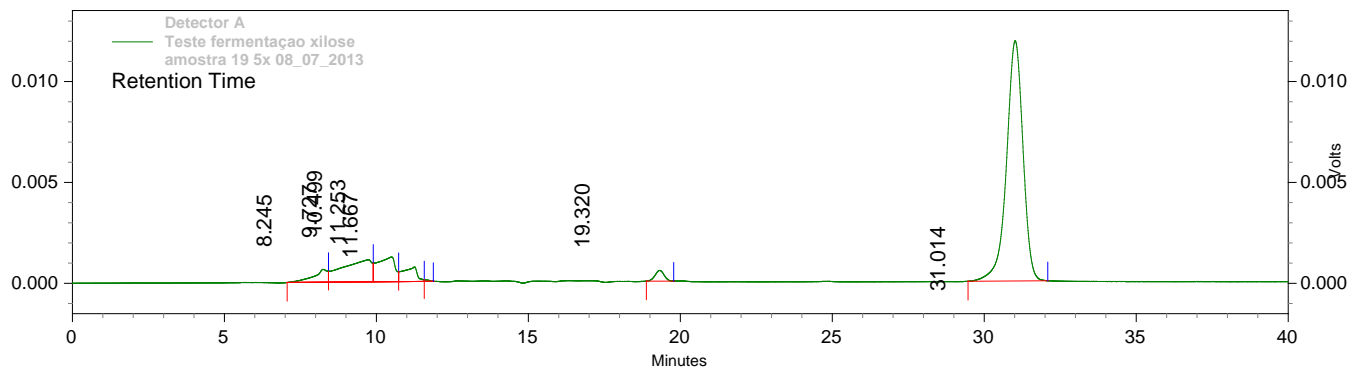
Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.235	20596	3.842	654	4.740
2	9.814	76281	14.231	1091	7.906
3	10.521	43380	8.093	1169	8.474
4	11.287	20033	3.737	660	4.785
5	19.315	9746	1.818	478	3.461
6	20.056	915	0.171	52	0.376
7	31.020	365065	68.107	9694	70.259
Totals		536017	100.000	13798	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 18 5x 08_07_2013a
 Acquired: 7/8/2013 2:29:23 PM
 Printed: 7/10/2013 10:18:04 AM



Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.245	19543	3.265	626	4.007
2	9.756	71953	12.022	1066	6.822
3	10.588	50388	8.419	1211	7.755
4	11.327	20400	3.408	692	4.431
5	19.313	20662	3.452	959	6.139
6	20.028	2251	0.376	98	0.627
7	31.013	413329	69.058	10969	70.220
Totals		598525	100.000	15621	100.000

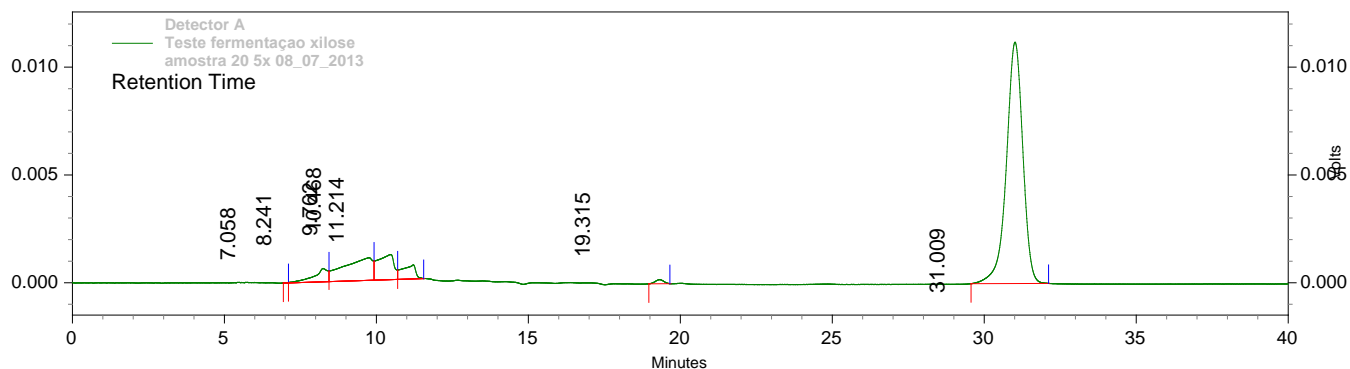
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 19 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 3:11:00 PM
 Printed: 7/10/2013 10:18:31 AM



Detector A

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	8.245	20499	3.268	636	3.928
2	9.727	73708	11.750	1098	6.781
3	10.499	49172	7.839	1223	7.553
4	11.253	23317	3.717	725	4.477
5	11.667	829	0.132	72	0.442
6	19.320	11010	1.755	530	3.275
7	31.014	448772	71.539	11907	73.545
Totals		627307	100.000	16189	100.000

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\amostra 20 5x 08_07_2013
 Acquired: 7/8/2013 3:52:37 PM
 Printed: 7/10/2013 10:20:07 AM



Detector A

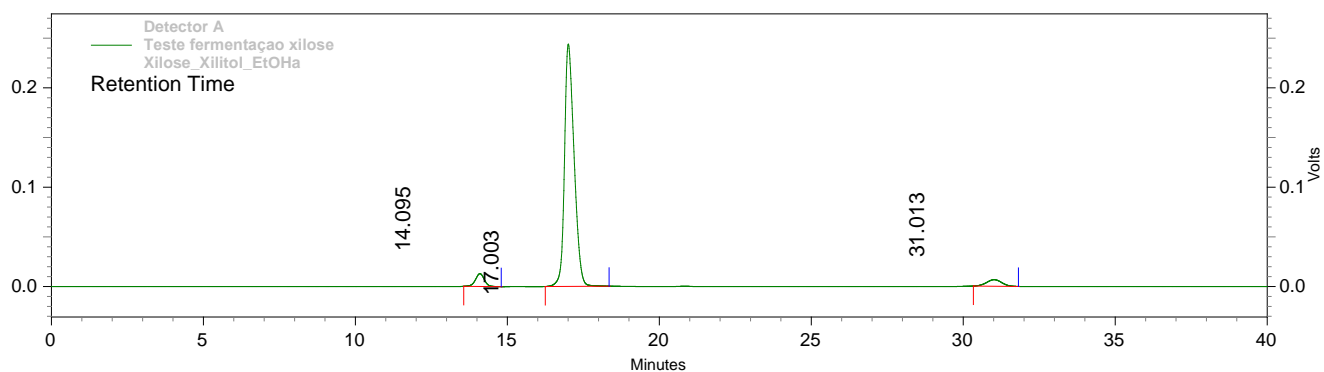
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	7.058	111	0.019	18	0.123
2	8.241	19782	3.426	618	4.154
3	9.762	69757	12.080	1048	7.045
4	10.468	43393	7.514	1160	7.800
5	11.214	19956	3.456	650	4.367
6	19.315	3639	0.630	188	1.263
7	31.009	420842	72.876	11194	75.248
Totals		577479	100.000	14876	100.000

Cromatograma de uma mistura preparada de xilose, etanol e xilitol:

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Dados\Coluna REZEX\Análises de 01_07_2013\Xilose_Xilitol_EtOHa

Acquired: 7/3/2013 4:10:34 PM

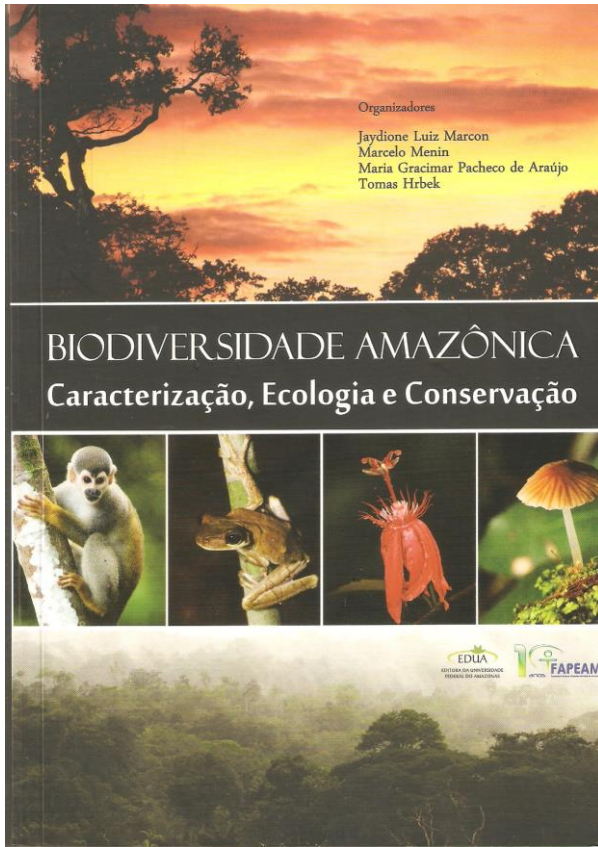
Printed: 7/10/2013 10:24:05 AM



Detector A					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1 (xilose)	14.095	260963	4.461	12907	4.906
2 (etanol)	17.003	5356988	91.581	243538	92.572
3 (xilitol)	31.013	231488	3.957	6634	2.522
Totals		5849439	100.000	263079	100.000

III. Produção Bibliográfica: Revisão de Literatura publicada em forma de Capítulo de Livro

Matos, I. T. S. R. ; Astolfi-Filho, S. . Riqueza de leveduras da Amazônia: alternativas para obtenção de produtos a partir da biomassa. *In: Marcon, J. L.; Menin, M.; Araújo, M. G. P.; Hrbek, T. (Org.). Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação.* 1ª ed. Manaus: EDUA, 2012, v. 1, p. 27-41. ISBN: 978-85-7401-687-0



Copyright © 2012 Universidade Federal do Amazonas
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

REITORA
Márcia Perales Mendes Silva

EDITORA
Iraíldes Caldas Torres

EDITORAÇÃO E PROJETO GRÁFICO
Edna Keron de Oliveira da Costa

CAPA
Phillip Klauvin Mouzinho de Almeida

FOTOS DA CAPA
Phillip Klauvin Mouzinho de Almeida

ESPÉCIES EM DESTAQUE
Capa
Saimiri sciureus (macaco-de-cheiro)
Osteocephalus taurinus (perereca)
Passiflora coccinea (maracujá-do-mato)
Aspergillus sp. (fungo)

Contra Capa
Argiope argentata (aranha)

Catálogo na Fonte

Marcon, Jaydione Luiz; Menin, Marcelo; Araújo, Maria Gracimar Pacheco; Hrbek, Tomas. (Org.).

Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. Jaydione Luiz Marcon, Marcelo Menin, Maria Gracimar Pacheco de Araújo e Tomas Hrbek. / Manaus: Edua, 2012.

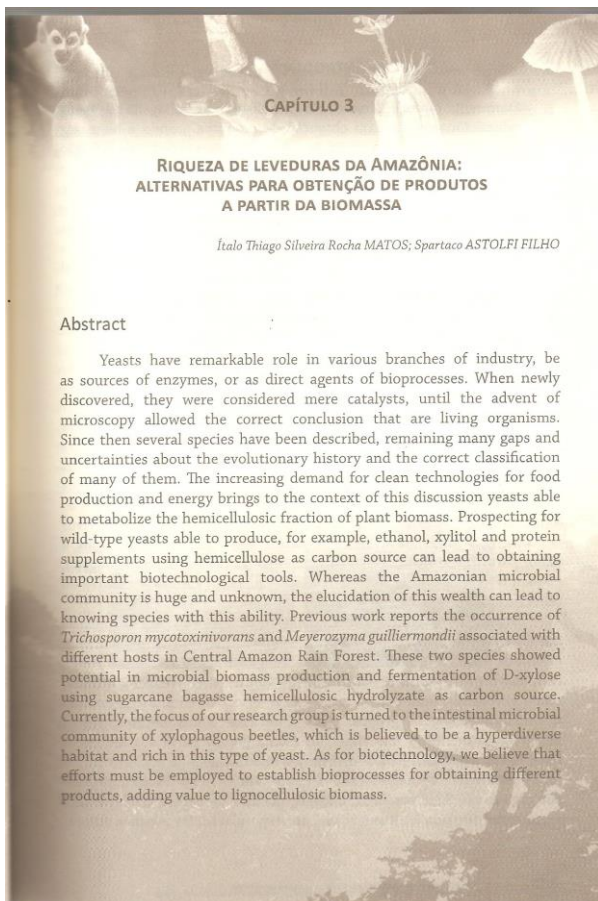
372 p.: il.; 16x23 cm

ISBN 978-85-7401-687-0

1. Ecologia – ambientes. 2. Biodiversidade – Amazônia. I. Título.

CDU 574.5

EDUA
Editora da Universidade Federal do Amazonas
Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3.000, Campus Universitário,
Curupado I – CEP: 69077-000, Manaus-AM
Fones: (066) 3305-4291 / 3305-4290 (Fax)
www.ufam.edu.br
edua_ufam@yahoo.com.br



CAPÍTULO 3

**RIQUEZA DE LEVEDURAS DA AMAZÔNIA:
ALTERNATIVAS PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS
A PARTIR DA BIOMASSA**

Italo Thiago Silveira Rocha MATOS; Spartaco ASTOLFI FILHO

Abstract

Yeasts have remarkable role in various branches of industry, be as sources of enzymes, or as direct agents of bioprocesses. When newly discovered, they were considered mere catalysts, until the advent of microscopy allowed the correct conclusion that are living organisms. Since then several species have been described, remaining many gaps and uncertainties about the evolutionary history and the correct classification of many of them. The increasing demand for clean technologies for food production and energy brings to the context of this discussion yeasts able to metabolize the hemicellulosic fraction of plant biomass. Prospecting for wild-type yeasts able to produce, for example, ethanol, xylitol and protein supplements using hemicellulose as carbon source can lead to obtaining important biotechnological tools. Whereas the Amazonian microbial community is huge and unknown, the elucidation of this wealth can lead to knowing species with this ability. Previous work reports the occurrence of *Trichosporon mycotoxinivorans* and *Meyerozyma guilliermondii* associated with different hosts in Central Amazon Rain Forest. These two species showed potential in microbial biomass production and fermentation of D-xylose using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate as carbon source. Currently, the focus of our research group is turned to the intestinal microbial community of xylophagous beetles, which is believed to be a hyperdiverse habitat and rich in this type of yeast. As for biotechnology, we believe that efforts must be employed to establish bioprocesses for obtaining different products, adding value to lignocellulosic biomass.

INTRODUÇÃO

O presente capítulo versará sobre a utilização de linhagens selvagens de leveduras amazônicas para obtenção de produtos usando a biomassa lignocelulósica como matéria prima. As atenções aqui serão dedicadas à fração hemicelulose desta biomassa. As seções iniciais farão uma contextualização no intuito de explicar ao leitor o desafio que representa a utilização de hemicelulose enquanto matéria prima. A seguir, discorreremos sobre leveduras, sua importância, diversidade, utilizações e potencialidades. Por fim, apresentaremos os trabalhos já desenvolvidos no âmbito dos Programas de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas, o panorama atual e potenciais futuros sobre a utilização de leveduras no contexto amazônico.

LEVEDURAS

Classificação, Riqueza e Potencial Biotecnológico

A taxonomia é o ramo da biologia dedicado à classificação dos seres vivos, descrevendo-os em grupos formados por similaridades morfológicas e moleculares, além de refletirem história evolutiva comum. Tradicionalmente, os organismos vivos eram agrupados exclusivamente com base na morfologia e demais características fenotípicas. Este sistema criou alguns equívocos ao longo da história da Ciência, como o agrupamento de todos os seres vivos em somente dois grandes reinos: Animal e Vegetal. Baseado nesta lógica, a maior parte dos fungos era equivocadamente posicionada no reino Vegetal, enquanto os fungos zoospóricos, por exemplo, eram agrupados dentro do reino Animal.

Durante a segunda metade do século XX, a proposição de um sistema de classificação que dividia os organismos vivos em cinco reinos foi amplamente difundida e aceita. A partir de então, os fungos integravam o reino Fungi, definidos como organismos eucariotos, dotados de parede celular quitinosa, tendo glicogênio como polissacarídeo de reserva. No entanto, a condição taxonômica de alguns grupos, como oomicetos e mixomicetos, seguia incógnita, já que estes não atendiam a uma grande parte dos requisitos fenéticos estabelecidos para as divisões do reino Fungi.

Blackwell e Spatafora (2004) descrevem o reino Fungi integrado por organismos heterotróficos, imóveis, dotados de parede celular e com reprodução, sexuada e/ou assexuada, por esporulação. Os mesmos autores

propõem, baseados em análise filogenética, que Fungi seja dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Alexopoulos et al. (1996) consideram a existência do filo-forma Deuteromycota, grupo no qual encontram-se fungos cuja fase de reprodução sexuada e/ou posição taxonômica não seja ainda esclarecida. Atualmente, existem cerca de 80.000 espécies de fungos descritas, estimando-se a existência de pelo menos 1,5 milhões de espécies, as quais devem ser descobertas, identificadas e incluídas nos quadros taxonômicos (BLACKWELL e SPATAFORA, 2004).

Foco deste capítulo, as leveduras são micro-organismos integrantes do reino Fungi, distribuídos entre os filos Ascomycota, Basidiomycota e no filo-forma Deuteromycota. Caracterizam-se por serem predominantemente unicelulares, realizando reprodução assexuada por brotamento e, em alguns casos, por fissão celular (BARNETT, 2004). Eventualmente, algumas espécies de fungos filamentosos podem apresentar forma leveduróide quando submetidos à escassez de O_2 e abundância de CO_2 . Apresentam hábito cosmopolita, sendo capazes de colonizar os mais diversos habitats, crescendo em condição sapróbia, comensal, parasita ou inquilina de outros organismos como plantas e animais (STAJICH et al., 2009). Quando cultivadas *in-vitro* formam, tipicamente, colônias com aspecto cremoso, embora algumas espécies apresentem crescimento colonial radial semelhante a fungos filamentosos (Figura 1).

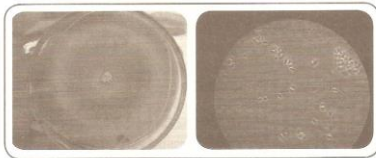


Figura 1

Levedura isolada do intestino de *Calosoma* sp. (A) Crescimento colonial com aspecto filamentosos; (B) Análise ao microscópio óptico permite a identificação de células de leveduras (aumento 400x). (Fotos: Ítalo T. S. R. Matos).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Consiste em um homopolímero de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A hidrólise por enzimas da família das celulases gera monômeros de glicose que, conforme mencionamos anteriormente, são facilmente metabolizados pelas leveduras tanto para produção de biomassa microbiana quanto para fermentação alcoólica.

Diferentemente, a hemicelulose é um heteropolímero composto por hexoses e pentoses, com destaque para estas últimas. É formado por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. A proporção de cada carboidrato também é variável, mas a xilose ocupa sempre lugar de destaque, podendo representar 89,3% dos carboidratos componentes da hemicelulose em alguns tipos de madeira (SAHA, 2003). Este é o segundo mais abundante polissacarídeo da biomassa vegetal.

A quantidade de hemicelulose em cada tipo de vegetal é variável de acordo com a espécie e as condições ambientais de cultivo. Este polímero está presente em diversos tipos de resíduos agroindustriais, podendo constituir substrato abundante e de baixo custo para a obtenção de produtos biotecnológicos tais como xilitol, etanol e proteína celular microbiana. A utilização da fração hemicelulósica da biomassa para obtenção de produtos com valor agregado reduziria a liberação de resíduos sólidos para o meio ambiente e seria interessante do ponto de vista econômico, devido ao baixo custo dos resíduos e o valor de mercado dos produtos.

O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2006), tem o caldo de cana como principal fonte de carbono para fermentação alcoólica. Por conseguinte, o bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante resíduo agrícola brasileiro, tendo sido produzidas 173,5 milhões de toneladas deste somente em 2009 (MATOS et al., 2012). A composição do bagaço é variável de acordo com as condições de cultivo do canavial, mas cerca de 35% deste corresponde a hemicelulose (SAHA, 2003). Diversos trabalhos citam D-xilose como o açúcar mais abundante da fração hemicelulósica do bagaço. Cheng et al. (2007) obtiveram xilose em fração superior a 50% dos componentes resultantes da hidrólise ácida de bagaço de cana.

Admitindo os valores propostos por Saha (2003) e Cheng et al. (2007), e considerando que fossem utilizadas as 30,4 milhões de toneladas de D-xilose produzidas pelo Brasil em 2009, em uma estimativa teórica seriam produzidas: 15,2 milhões de toneladas de etanol (14,7 bilhões de reais - R\$ 1,30/L); 30,4 milhões de toneladas de xilitol (4,9 trilhões de reais - R\$ 177,00/kg) ou 20 milhões de toneladas de extrato de leveduras (7,2 trilhões de reais - R\$ 360/kg). Tal rentabilidade, no entanto, esbarra no principal

Segundo Barnett (2003), as leveduras foram inicialmente descobertas em processos fermentativos de vinho e cerveja, os quais eram considerados meros processos físico-químicos dos quais as leveduras eram catalisadoras. O desenvolvimento da síntese de substâncias usando somente catalisadores químicos fortalecia o argumento de que o levedo usado na produção do vinho, do álcool e da cerveja era apenas um catalisador da reação, e não um organismo vivo. O crescimento do levedo durante a fermentação era ignorado pelos cientistas, que não admitiam que o processo fosse efetuado por seres vivos.

Somente em meados dos anos 1830, com o aperfeiçoamento do microscópio óptico, as estruturas celulares de leveduras foram descritas e reconhecidas como organismos vivos. Trinta anos mais tarde, após diversos debates e embates acalorados e os consistentes trabalhos de Pasteur, a comunidade científica passou a admitir que as leveduras fossem organismos vivos. A aplicabilidade industrial é um fato marcante entre estas, observado em várias espécies principalmente do subfilo Saccharomycotina (STAJICH et al., 2009).

Entre as aplicações biotecnológicas de leveduras, a fermentação alcoólica é a mais disseminada, sendo empregada pela humanidade desde os tempos mais remotos, na produção de cervejas, vinhos e pães (DEMAIN e SOLOMON, 1981). Estes processos baseiam-se na utilização de hexoses pela via glicolítica para a produção de etanol e dióxido de carbono. O aproveitamento da habilidade das leveduras em fermentar hexoses é amplamente dominado pela indústria. Entretanto, um limitado número de espécies conhecidas é capaz de fermentar pentoses, o que torna a busca por novas espécies/linhagens microbianas selvagens dotadas desta habilidade um importante passo (HAHN-HÅGERDAL et al., 2007).

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Bioprodutos, Rentabilidade e Entraves

Denominamos biomassa lignocelulósica o conjunto dos polímeros estruturais presente nos vegetais, sendo estes a lignina, a celulose e a hemicelulose. O primeiro tem função basicamente de sustentação e proteção mecânica, conferindo consistência lenhosa aos tecidos em que se impregna. Serão focos desta seção os dois últimos por conta de terem maior aplicabilidade aos processos fermentativos.

fator limitante: o número relativamente pequeno de espécies conhecidas hábeis em metabolizar D-xilose.

A fração hemicelulose e seus derivados não estão prontamente acessíveis à assimilação e fermentação por micro-organismos dotados desta habilidade. Entre o estado polimérico da biomassa e os açúcares fermentescíveis, encontram-se os principais gargalos tanto do ponto químico/bioquímico como financeiro. A hidrólise é o processo empregado para sacarificação, isto é, tornar os carboidratos poliméricos em açúcares solúveis disponíveis à fermentação. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser hidrolisado por meio de auto-hidrólise, hidrólise enzimática e hidrólise ácida.

A auto-hidrólise consiste em tratamento por choque térmico a temperaturas superiores a 190 °C, resultando na conversão de hemicelulose a xilo-oligosacarídeos. A hidrólise enzimática é feita pela mistura de certa quantidade de enzimas ao substrato lignocelulósico, liberando açúcares fermentáveis. O problema destes processos está principalmente no custo, pela intensa demanda de calor, necessária à auto-hidrólise, e o preço elevado das enzimas, bem como os gastos na manutenção de temperatura e pH ótimos a atividade enzimática. Além disso, as enzimas hemicelulolíticas não podem ser usadas na hidrólise direta, pois são inibidas pela estrutura cristalina da lignocelulose, sendo necessário empregar pré-tratamento físico e/ou químico para obtenção de hidrólise completa (PANDEY et al., 2000; WHITE et al., 2008; CANILHA et al., 2010).

A utilização de ácidos inorgânicos diluídos, como HCl, HNO_3 e H_2SO_4 , levam à hidrólise quase completa da fração hemicelulósica em unidades monoméricas de pentoses e hexoses (WHITE et al., 2008). Este processo gera muitos inibidores ao crescimento microbiano, como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos fórmico, levulínico e acético. Para tornar o crescimento microbiano viável, diversas técnicas de detoxificação podem ser empregadas. Entre estas temos centrifugação, filtração, adição de carvão ativado, eletrodialise, adição de hidróxido de cálcio e biodetoxificação (CANILHA et al., 2010; HOU-RUI et al., 2009). Algumas técnicas de detoxificação podem ainda provocar a redução na concentração de açúcar reductor entre 5% e 12% (CANILHA et al., 2010).

O emprego de técnicas simples para detoxificação de hidrolisados hemicelulósicos leva à obtenção de substratos com elevados teores de inibidores, podendo ser empregados como meios seletivos para micro-organismos de alta resistência. Esta característica pode baratear os produtos biotecnológicos baseados em hidrolisados hemicelulósicos, haja vista a redução nos investimentos necessários à detoxificação.

A diversidade de leveduras amazônicas, em seu estado incógnito, pode conter em si diferentes espécies dotadas de tais habilidades e aplicáveis à obtenção dos produtos supracitados. Este ramo da pesquisa foi iniciado no âmbito dos Programas de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas, com alguns resultados promissores, como veremos a seguir.

DIVERSIDADE / RIQUEZA DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS

Da assimilação de hemicelulose à fermentação de D-xilose

Conforme descrito, a obtenção de produtos biotecnológicos baseados em hemicelulose tem perspectivas promissoras, mas que demandam muito esforço de pesquisa especialmente no que se refere aos micro-organismos hábeis em metabolizar esse substrato e seus derivados. A pergunta que tentamos responder é: como a diversidade microbiana da Amazônia se posiciona num contexto de obtenção destes produtos?

A condição megadiversa do bioma Amazônia é amplamente conhecida e difundida, restando muito desconhecimento sobre o número de espécies que compõem essa diversidade. Diversos trabalhos científicos versam sobre a busca por micro-organismos e/ou processos que conduzam à obtenção de produtos biotecnológicos baseados em hemicelulose (MATOS, 2010). Em um extenso levantamento bibliográfico, diversos artigos relatam a construção e emprego de micro-organismos recombinantes. Poucos trataram do isolamento e utilização de leveduras selvagens para utilização de hemicelulose, sendo que, em nenhum dos casos, o isolamento foi efetuado a partir de habitats amazônicos.

Igualmente escasso é o número de trabalhos científicos atuais que tratam da riqueza de espécies microbianas da Amazônia. A megadiversidade amazônica encontra-se, portanto, em condição incógnita, e aparentemente continuará assim por um período longo. Esta expectativa se baseia no fato de que poucos grupos de pesquisa tem se dedicado a tal tarefa, sendo menor ainda o número de grupos que busca a aplicação de espécies selvagens aos propósitos supracitados.

Entre os estudos efetuados objetivando o isolamento de espécies de leveduras selvagens hábeis em metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, os resultados são animadores. Em sua dissertação de mestrado, desenvolvida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em

Diversidade Biológica, Matos (2010) considerou quatro diferentes biótopos na Amazônia: solos de savanas no estado de Roraima, solos de matas de terra firme no Amazonas, conteúdo intestinal de cupins (*Nasutitermes* sp.) e besouros do gênero *Calosoma* (Artrópoda, Insecta, Carabidae).

As amostras de solo foram escolhidas como habitats em potencial para as leveduras de interesse levando em conta o volume de biomassa lignocelulósica que é decomposto pela atividade microbiana. Quanto aos insetos, os cupins (*Nasutitermes* sp.) foram selecionados em função da xilofagia, isto é, alimentam-se basicamente de madeira. Considerando que menos de 10% das enzimas empregadas na digestão da madeira é produzida pelos cupins (BREZNAK, 1982), a suposição de que encontrar-se-ia leveduras hemicelulolíticas nestes insetos pareceu razoável. *Calosoma* é um gênero de besouros carnívoros, mas que apresentam hábito alimentar xilófago durante a fase larval (LIMA, 1945). Segundo Suh et al. (2005), o intestino de besouros é um habitat inexplorado e hiperdiverso em espécies de leveduras ainda não descritas. Os cupins foram manuseados até a extrusão do aparelho digestório (Figura 2A), enquanto que os espécimes de *Calosoma* sp. tiveram seus intestinos dissecados (Figura 2B).

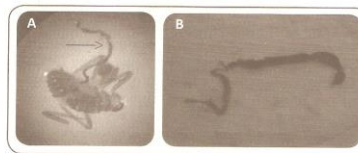


Figura 2

A. Espécime de *Nasutitermes* sp. manuseado até a extrusão do tubo digestório (seta). B. Tubo digestório de um espécime de *Calosoma* sp. dissecado com pinças e tesouras cirúrgicas. (Fotos: Ítalo T. S. R. Matos).

Para o isolamento das leveduras, o meio seletivo foi produzido utilizando hidrolisado ácido hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HACA) como fonte única de carbono. Para obtenção do HACA, o bagaço de

cana-de-açúcar foi lavado para retirada de sacarose residual e desidratado em estufa de secagem a 70 °C. A seguir, o bagaço foi imerso em ácido sulfúrico 3%, com razão sólido líquido de 1:4. Após 24 horas a temperatura ambiente, a mistura foi autoclavada a 121 °C por 40 minutos. A fase líquida foi separada e neutralizada pela adição de hidróxido de cálcio. Por fim, a solução foi filtrada e o meio líquido utilizado como fonte de carbono para seleção de micro-organismos, conforme descrito por Vargas Betancur e Pereira Jr (2010). Considerando que o pré-tratamento empregado gera grande quantidade de inibidores do crescimento microbiano, o meio obtido tinha elevado poder de seleção de leveduras hábeis em metabolizar hemicelulose e tolerantes a inibidores.

O isolamento das leveduras deu-se em placas de Petri contendo meio composto por HACA, *Yeast Nitrogen Base* (livre de aminoácidos ou outras fontes de carbono) e Agar. Foram selecionadas ao todo 76 leveduras, obtidas conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Total de colônias isoladas segundo o habitat pesquisado

Habitat	Número de isolados	Assimiladores de D-xilose	Fermentadores de D-xilose
Solos de savana de Roraima	2	0	–
Solos de terra firme	8	4	–
Intestino de <i>Calosoma</i> sp.	12	12	2
Intestino de <i>Nasutitermes</i> sp.	54	12	1

A pequena quantidade de isolados obtidos a partir das amostras de solo deu-se provavelmente em razão da alta seletividade do meio, já que a atividade microbiana decompositora de lignocelulose em solos amazônicos é

conhecidamente intensa. Outro fato relevante foi a ausência de crescimento bacteriano e o escasso número de fungos filamentosos, demonstrando a elevada seletividade do meio.

Os isolados foram submetidos a ensaios de fermentação de D-xilose, a fim de serem posteriormente selecionados para bioprocessos e identificados por técnicas clássicas e moleculares. A habilidade em fermentar D-xilose foi verificada em três isolados, sendo duas oriundas de *Calosoma* sp. e uma de *Nasutitermes* sp. A capacidade fermentativa foi atestada pela retenção em tubos de Durham do gás desprendido durante o processo fermentativo, conforme exemplificado na Figura 3.



Figura 3

Prova de fermentação de D-xilose por retenção de gás em tubos de Durham, conforme descrito por Barnett et al. (1990). Resultado positivo ao centro. (Foto: Ítalo T. S. R. Matos).

A identificação taxonômica dos três isolados fermentadores de D-xilose foi executada utilizando técnicas de biologia molecular e provas bioquímicas utilizando o kit ID32C, da Biomerieux®. Os dados sobre assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram plotados no aplicativo *online ApiWeb*®, o qual compara o perfil bioquímico apresentado com outros depositados na base de dados da Biomerieux®. O DNA genômico foi extraído, seguindo a amplificação e sequenciamento da região ITS1. As sequências foram analisadas pela ferramenta *Nucleotid BLAST*, na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências obtidas foram depositadas no *GenBank*, sob números de acesso JN974905 e JX861097.

As duas linhagens isoladas de *Calosoma* sp. foram identificadas como *Trichosporon mycotaximvorans*, enquanto a linhagem obtida de *Nasutitermes* sp. foi identificada como sendo *Meyerozyma guilliermondii*. Foi a primeira descrição da ocorrência destas espécies associadas a estes hospedeiros na Amazônia Central.

Quando cultivada em HACA, *T. mycotoxinivorans* demonstrou habilidade em assimilar os açúcares presentes naquele substrato, consumindo cerca de 80% dos açúcares redutores totais e elevando o pH do meio de 5,0 para 7,5. Este isolado demonstrou ainda elevado potencial na produção de biomassa, produzindo 0,71 g de biomassa por grama de açúcar consumido. Sua tolerância ao HACA foi considerada moderada, com 65,5% de células viáveis ao final do cultivo.

A espécie *T. mycotoxinivorans* foi descrita pela primeira vez por Molnar et al. (2004), que isolaram a linhagem associada a cupins terrícolas da espécie *Mastotermes darwiniensis*, no deserto da Austrália. A ocorrência desta espécie foi descrita ainda em associação ao besouro xilófago *Phrenanetes bennetti* (Tenebrionidae), coletados no Panamá por Suh et al. (2005). Hickey et al. (2009) menciona *T. mycotoxinivorans* na condição de patógeno do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística em San Antonio, Texas, USA. Ntougias et al. (2010) descrevem a ocorrência desta espécie na microbiota decompositora de resíduos de uva, em uma indústria de vinho no sul do Peloponeso, Grécia. Estas e outras menções sugerem que *T. mycotoxinivorans* apresenta hábito cosmopolita e patogenicidade oportunista, características comuns a este gênero (CHAGAS-NETO et al., 2008).

Alguns trabalhos mencionam a utilização de *Trichosporon* spp. na produção de biosurfactantes (MAKKAR et al., 2011), na produção de amilases extracelulares (LIN e TANAKA, 2006), e na utilização de lignocelulose para produção de lipídios (CHEN et al., 2009; HUANG et al., 2012). Quanto a *Trichosporon mycotoxinivorans*, a única menção encontrada referente a potencial biotecnológico diz respeito à notável habilidade na detoxificação das micotoxinas Ochratoxina A e Zearalenona, contaminantes em estoques de culturas importantes como milho, sorgo, cevada e aveia. Nenhum trabalho anterior investigou o potencial de *T. mycotoxinivorans* na utilização de lignocelulose, sendo este um trabalho pioneiro.

A sequência da região ITS1 do isolado obtido de *Nasutitermes* sp. apresentou 100% de similaridade com *Pichia guilliermondii*. Esta espécie é também identificada em estado anamorfo pela sinonímia *Candida guilliermondii*. Considerando que o clado *Pichia* é polifilético, Kurtzman e Suzuki (2008) propuseram, baseados em análise filogenética, que as espécies *P. guilliermondii* e *P. caribica* fossem agrupadas em um novo gênero, denominado *Meyerozyma*. Considerando que a proposta tem sido amplamente aceita, adotou-se esta denominação neste trabalho.

Semelantemente a *T. mycotoxinivorans*, *Meyerozyma guilliermondii* neutralizou o meio, elevando o pH de 5,0 para 7,6. Foram consumidos 78,6% dos açúcares redutores totais, com produção de 0,52g de biomassa por grama de açúcar consumido. A despeito de apresentar menor rendimento

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*, 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 880p.
- BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, v.149, p.557-567. 2003.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 8: Taxonomy. *Yeast*, v.21, p.1141-1193. 2004.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- BLACKWELL, M. AND SPATAFORA, J. W. Fungi and their allies, p. 7-22. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
- BREZNAK, J. A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Review of Microbiology*, v.36, p.323-343. 1982.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.161, p. 84-92. 2010.
- CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*, v.166, n.3, p.121-132. 2008.
- CHEN, X.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, F.; RYU, D. D. Y.; BAO, J. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.159, p.591-604. 2009.
- CHENG, R. K.; GE, J. P.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; YANG, M. D.; XU, J. M. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology letters*, v.29, p.1051-1055. 2007.
- CUNHA, A. F.; MIYASAWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F.; PEREIRA, G. A. G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Research*, v.6, p.280-287. 2006.
- DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. Industrial microbiology: Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. *Scientific American*, v.245, n.3, p.43-52. 1981.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.74, p.937-953. 2007.
- HICKEY, P. W.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; WICKES, B. L.; SCHMIDT, H. J.; WALSH, T. J. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory

de biomassa, *M. guilliermondii* apresentou maior tolerância ao HACA, com 90,3% de células viáveis ao final do cultivo.

A neutralização do meio e a elevada tolerância ao HACA endossam a afirmação de Parawira e Tekere (2011) sobre a capacidade de biodetoxificação apresentada pelo anamorfo *Candida guilliermondii* frente a hidrolisados hemicelulósicos. Esta espécie apresenta conhecida habilidade na produção de xilitol (MUSSATO et al., 2005) e etanol (RAO et al., 2008).

Ambas as espécies apresentaram potencial biotecnológico na produção de biomassa microbiana, na utilização dos açúcares presentes no HACA e na tolerância aos inibidores presentes neste substrato. Novos trabalhos tem sido realizados no intuito de desenvolver bioprocessos usando estes isolados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Observa-se que em um trabalho de pesquisa realizado em prazo inferior a vinte e quatro meses, foram identificadas duas espécies com potencial de utilização de lignocelulose para obtenção de etanol, xilitol e biomassa microbiana. Para conduzir as mesmas dos potenciais à real utilização em bioprocessos, muito esforço de pesquisa deve ser empreendido, o que demandará novos investimentos e, principalmente, recursos humanos.

Em função de sua megadiversidade, a ainda pouco conhecida microbiota amazônica poderá constituir extensa fonte de micro-organismos aplicáveis para os mais diversos fins, seja na produção de enzimas industriais, tratamento de efluentes, produção de biocombustíveis, ou ainda como hospedeiros ou fontes de genes de interesse à engenharia metabólica, contribuindo assim para geração de renda aos povos amazônicos e criando condições para minimizar a necessidade de desflorestamento.

Os esforços de pesquisa agora se concentram no estudo da microbiota intestinal de besouros xilófagos, baseado na hipótese de ser este um habitat hiperdiverso, rico em espécies de leveduras ainda não descritas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas.

pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.10, p. 3091-3097. 2009.

HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S. S.; SARROUH, B. E.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J. AND QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.52, p.199-212. 2009.

HUANG, C.; WU, H.; LI, R.; ZONG, M. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. *New Biotechnology*, v.29, n.3, p.372-378. 2012.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babejiella*, *Meyerozyma*, *Milleriozyma*, *Pricomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, v.51, p.2-14. 2008.

LIMA, M. C. Coleópteros. In: *Insetos do Brasil*. Tomo 7, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1945. p.257-269.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.69, p.627-642. 2006.

MAKKAR, R. S.; CAMBOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, v.1, n.5, p.1-19. 2011.

MATOS, I. T. S. R. *Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose*. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus: UFAM, 2010. 68p.

MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; COSTA NETO, P. Q.; ASTOLFI FILHO, S. Cultivation of *Trichosporon mycotoxinivorans* in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.15, n.1, p.1-7. 2012.

MOLNAR, O.; SCHATZMAYR, G.; FUCHS, E.; PRILLINGER, H. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, v.27, n.6, p.661-671. 2004.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, v.40, p.3801-3806. 2005.

NTOUGIAS, S.; KAVROULAKIS, N.; PAPDOPOULOU, K. K.; EHALIOTIS, C.; ZERVAKIS, G. I. Characterization of cultivated fungi isolated from grape marc wastes through the use of amplified rDNA restriction analysis and sequencing. *The Journal of Microbiology*, v.48, n.3, p.297-306. 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.*, v.74, p.69-80. 2000.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.31, n.1, p.20-31. 2011.

- RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*, v.47, p.19-24. 2008.
- SAHA, B. C. Hemicellulose biococonversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.30, p.279-291. 2003
- STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y. SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The Fungi. *Current Biology*, v.19, n.18, p.840-845. 2009.
- SUH, S. O.; MCHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D. AND BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycology Research*, v.109, n.3, p.261-265. 2005
- VARGAS BETANCUR, G. J.; PEREIRA JÚNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pre-treatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.13, n.3. 2010
- WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K. and WALKER, G. M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Research*, v.8, p.1175-1184. 2008.