

Seleção de linhagens fúngicas isoladas de larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera) para obtenção de enzimas de interesse industrial na Amazônia

Screening of fungal strains isolated from Simuliidae (Insecta: Diptera) larvae to obtain enzymes of industrial interest in the Amazon

DOI: 10.34188/bjaerv6n4-021

Recebimento dos originais: 05/08/2023

Aceitação para publicação: 30/09/2023

Bruno Romany Dos Santos

Bacharel em Biologia, pelo Centro Universitário do Norte, UNINORTE
Instituição: Centro Universitário do Norte
Rua Joaquim Nabuco, 1232, Centro, Manaus- Amazonas, Brasil
E-mail: b.romany@uol.com.br

Roberto Nobuyuki Maeda

Doutor em engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Escola de Química
Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco E121, Cidade Universitária, 21.941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brasil
E-mail: rmaeda76@gmail.com

Neusa Hamada

Doutora em Entomologia pela Universidade de Clemson, Estados Unidos da América
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Entomologia
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, 69011-970, Manaus-AM, Brasil
E-mail: nhamada@inpa.gov.br

Yamile Benaion Alencar

Doutora em Entomologia pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Entomologia
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, 69011-970, Manaus-AM, Brasil
E-mail: yamile.alencar@gmail.com

RESUMO

As enzimas estão entre os principais alvos de pesquisas biotecnológicas pelo seu importante papel nos mecanismos celulares e aplicações em processos industriais. O objetivo do estudo foi selecionar linhagens de fungos, isoladas de larvas de Simuliidae, produtoras das enzimas amilase e celulase em meio de cultura sólido. Foram utilizadas 37 linhagens fúngicas cultivadas e armazenadas no INPA. Para o crescimento das diferentes linhagens fúngicas e indução das enzimas foi utilizada solução de Manachini, suplementada de substrato indutor. O cultivo das linhagens foi realizado com inóculo direto de 5×10^6 esporos/mL, mantidos sob agitação a 140 rpm em temperatura ambiente durante 72 horas. Ao término do período de incubação, as culturas foram filtradas e, em seguida foram adicionados 50µL do filtrado em meio de cultura sólido pela técnica de “Cup plate”. As placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas a 37° C durante 72 horas. Foram utilizadas soluções reveladoras de atividade enzimática, iodo 0,1 Mol/L e solução de vermelho congo a 0,1%), para amilases e celulases, respectivamente. A atividade enzimática foi detectada pelo diâmetro do halo. Do total de 37 linhagens analisadas, 60% apresentaram degradação de substrato tanto para amilase como para celulase e 40% não apresentaram atividade para estas enzimas. As espécies com maior nível de degradação do substrato foram *Aspergillus japonicus* Saito (halo= 7mm, celulase) e

Trichoderma harzianum Rifai (halo= 5mm, amilase). Constatase assim o potencial desses microrganismos para aplicação industrial, criando novas oportunidades para o desenvolvimento do mercado de enzimas na Amazônia.

Palavras-chave: Simuliidae, amilase, celulase, ensaios enzimáticos.

ABSTRACT

The enzymes are the main target of biotechnological research because of its importance in cellular mechanisms and applications in industrial processes. The objective of this study was to select fungal species producers of amylase and cellulase enzymes in solid culture media. 37 fungal lineages were used from the fungus culture collection of Insecta (Diptera) located at the INPA. For the growth of different species and fungal enzyme induction it was used the Manachini solution, supplemented of inducer substrate. The fungal lineages culture was done with direct inoculum of 5×10^6 spores/mL, supplemented of inducer substrate, kept under shaking at 140 rpm at room temperature for 72 hours. At the end of the period of incubation the cultures were filtered and then were added 50 μ l of culture filtrate in solid culture media with Cup plate technique. The plates were involved in aluminum foil and incubated at 37 °C for 72 hours. Solutions have been used for revealing enzyme activity (Iodine solution 0.1 N, red congo 0.1%) for amylase and cellulase respectively. The enzyme activity was determined by the diameter of the halo. Of the total of 37 strains tested, 60% showed degradation of substrate for both amylase and cellulase, 40% did not show activity for these enzymes. The species that presented the highest activities of substrate degradation were *Aspergillus japonicus* Saito (halo = 7mm, cellulase) and *Trichoderma harzianum* Rifai (halo = 5 mm, amylase). It was verified thus the potential of these microorganisms for industrial application, creating new opportunities for development of enzymes market in Amazonia.

Keywords: Simuliidae, amylase, cellulase, enzymatic assays.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre a ocorrência de micro-organismos endosimbiontes, principalmente o isolamento e caracterização de fungos e bactérias, são relativamente recentes, constatando-se sua presença em larvas de Diptera Muscidae (Sales *et al.* 2002), Simuliidae (Alencar *et al.* 2003) e Culicidae (Pereira *et al.* 2005).

O termo endosimbionte refere-se a micro-organismos que residem nos tecidos internos de animais sem causar nenhum sintoma de doença (Vega & Dowd 2005). Nos casos de endossimbiose em que os micro-organismos se encontram nos tecidos internos do intestino, estes micro-organismos têm função vital ao hospedeiro, hidrolizando compostos complexos como polímeros glicídicos a monômeros. Este tipo de endossimbiose favorece o hospedeiro, que não produz naturalmente enzimas hidrolíticas específicas, sendo necessária à presença de microrganismos no hospedeiro.

Tem se demonstrado que larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) são importantes portadores de endosimbiontes em ambientes aquáticos na Amazônia (*e.g.* Alencar *et al.* 2003). Isso ocorre, principalmente, pela característica forma de obtenção do alimento das larvas, que filtram diversos materiais particulados em suspensão na água, ingerindo microalgas e outras partículas

vegetais ou animais, menores até mesmo que bactérias (Freeden 1964). Sendo assim, sugere-se que micro-organismos endosimbiontes no trato gastrointestinal de larvas de Simuliidae têm funções importantes na digestão dos alimentos, compostos majoritariamente de celulose, hemicelulose, amido e quitina, produzindo enzimas hidrolíticas como quitinases e polissacaridasas, que incluem celulasas, hemicelulasas e amilases (Alencar *et al.* 2003, Veja & Blackwell 2005).

Muitos são os trabalhos relatando o potencial e aplicabilidade das enzimas amilolíticas e celulolíticas, na indústria do etanol, farmacêutica, têxtil, couro, papel e alimentícia (Pszczola 2001, Gupta *et al.* 2003, Pandey *et al.* 2005, Ribeiro *et al.* 2018). O mercado mundial de enzimas, embora significativo, ainda é modesto quando comparado ao de outros produtos biotecnológicos, como é o caso do mercado de antibióticos (Novo Nordisk 1996, Bajpai & Bajpai 1996).

Tendo em vista o interesse em nível mundial por novas fontes de enzimas de uso industrial, a presente pesquisa teve como objetivo selecionar espécies de fungos, isolados de larvas de Simuliidae, produtores de amilase e celulase em meio de cultura sólido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado, durante o período de setembro a outubro de 2003 e de maio a junho de 2004. As linhagens fúngicas estudadas são provenientes de cultivos armazenados no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA (Tabela 1).

Os fungos selecionados para teste, foram primeiramente transplantados para meios de cultivo específico de acordo com a espécie fúngica (Agar malte e Agar batata dextrose), incubados a temperatura de 28° C por sete dias e posteriormente identificados por meio de suas características macro-microscópica (sexual e assexual), usando técnica de cultura em lâmina e literatura específica (Riddel 1950, Arx 1981).

A partir da cultura pura foi preparada uma suspensão de esporos, em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota para contagem de conídios em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Raimbault & Alazard 1981).

Para o crescimento das diferentes linhagens de fungos e indução de enzimas, utilizou-se solução de Manachini (KH₂PO₄ - 2.0g; (NH₄)₂SO₄ - 1.0g; MgSO₄·7H₂O - 0.1g; NaH₂PO₄·H₂O - 0.9g; Extrato de levedura - 1.0g; Água destilada 1000 ml), suplementada com diferentes substratos indutores (amido e carboximetilcelulose), numa proporção de 0,5%, ajustando-se o pH de cada meio de acordo com a enzima a ser analisada (amilase pH 6,0 celulasas pH 5,0). O cultivo foi mantido sob agitação constante a 140 rpm durante 72 horas em agitador horizontal e temperatura ambiente (37 °C) (Manachini *et al.* 1987).

Ao término do período de incubação, as culturas foram filtradas para separar a massa micelial do fluido da cultura e posterior determinação enzimática qualitativa e quantitativa.

Para detecção qualitativa da atividade amilásica medida através maior halo de degradação dos filtrados das culturas, foi utilizada a técnica de análise em meio sólido, Agar amido em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0. A detecção da atividade celulásica também foi realizada em meio sólido contendo carboximetilcelulose, tamponado com tampão acetato de Na 0,1 M. pH 5,0. Para isso, adicionou-se 50 μ L do filtrado em orifícios “cup plate” de 3,5 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura específico, em placas de Petri individuais para cada linhagem, placas foram incubadas a 37° C durante 24 horas.

Após o período de incubação, a solução reveladora, específica para cada enzima, foi aplicada na superfície do agar. As soluções reveladoras utilizadas foram: solução de iodo 0,1 mol/L (amilase), e solução de vermelho congo a 0,1% (celulases). Foram considerados resultados positivo para atividade enzimática, o surgimento de halos transparente em volta dos orifícios.

A atividade quantitativa da glucoamilásica foi realizada em espectrofotométrico. Para reação enzimática, foram utilizados como substrato solução de amido 1%, tamponada em tampão citrato 50 mM pH 4,5 e que foi adicionado de extrato enzimático 100ul, a mistura reacional foi incubada a 60 °C por 30 minutos. Em seguida foi determinada a concentração de açúcares redutores, liberada na reação, pelo método colorimétrico do ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

A atividade celulase total, foi determinada em papel filtro de acordo com Ghose (1987), uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1x6 foi inserida em tubos de ensaio, em seguida foi adicionado 1 mL de tampão citrato pH 5,0 e 0,5 ml do filtrado diluído, no mesmo tampão. Os tubos foram incubados a 50 °C por 1h. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de DNS (Miller, 1959).

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada de acordo com Ghose (1987). Em microtubos eppendorfs foram adicionados 50 μ L de solução de CMC 1 % em tampão citrato pH 5,0 em seguida, adicionaram-se 50 μ L de enzima (extrato bruto) e incubou-se a 50 °C por 30 min. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de DNS (Miller, 1959).

Quanto à atividade β -glicosidase, foi utilizada como substrato, solução de celobiose a 2 % e a glicose liberada foi determinada por método enzimático de glicose oxidase (KIT GOD).

Uma unidade de enzima analisada foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 87 linhagens fúngicas oriundas da coleção de cultura de micro-organismos endosimbiontes de larvas de Insecta (Diptera) do INPA, 37 linhagens fúngicas distintas, foram selecionadas para avaliar o potencial de degradar as enzimas amilase e celulase. Na Tabela 2 pode-se observar o número de isolados fúngicos em diferentes espécies de larvas de Simuliidae. Os gêneros predominantes nas larvas foram *Penicilium*, *Trichoderma* e *Gliocladium*.

Nos resultados da atividade enzimática das 37 linhagens fúngicas analisadas foi possível constatar que 60% apresentaram atividade amilolítica e celulolítica. O maior nível de degradação do substrato foi observado para *A. japonicus* (halo= 7 mm, celulase) e *T. harzianum* (halo= 5mm, amilase) (Fig. 1). Na Figura 2 pode-se observar os diâmetros dos halos produzidos por espécies de *Penicilium* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., constatando-se assim o potencial desses microrganismos para produção dessas enzimas.

O resultado obtido na presente pesquisa embora preliminar é o primeiro a utilizar larvas de Simuliidae, inseto de importância médica para a busca de compostos de interesse econômico na Amazônia. Acredita-se que o potencial da maioria das linhagens analisadas para produzir enzimas amilolíticas e celulolíticas possa estar relacionado aos alimentos ingeridos e os ambientes por estas colonizadas, tendo em vista que as larvas ingerem grande quantidade de microalgas, dentre estas as do grupo das *Bacillariophytas* ou algas diatomáceas que apresentam como característica a presença de sílica (SiO₂) em sua parede celular (Lozovei 1989, Alencar *et al.* 2001). De acordo com Hamada & Adler (2001) as larvas de Simuliidae colonizam diferentes tipos de habitats, tanto áreas abertas pela ocupação humana quanto ambientes preservados, de mata primária.

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam potencial biotecnológico, e juntos tem sido mundialmente estudado por seus metabólitos de interesse industrial (Osterhage *et al.* 2000). No presente estudo, *T. harzianum* mostrou ser a espécie de melhor produção de biomassa em meio líquido (em 72 horas), quando comparada às demais espécies analisadas, apresentando crescimento micelial de aproximadamente 5 mg em 50 mL de solução. Porém, *A. japonicus* apresentou crescimento micelial em menor tempo de incubação (48 horas), portanto uma espécie promissora para ser utilizada industrialmente.

A habilidade desses microrganismos em sintetizar enzimas de interesse econômico tem sido foco de muitos experimentos laboratoriais na região Amazônica, entretanto a maioria é relatada apenas em dissertações e resumos de congressos (*e.g* Teixeira 1994, Fernandes 1999, Cassa-Barbosa 2001).

Oliveira *et al.* (2006) utilizando isolados de rizóbia para detectar atividades amilolíticas, celulolíticas, lactolíticas, pectinolíticas e proteolíticas, em meio YMA modificado foi o primeiro a

constatar isolados de rizóbia como fonte promissora de enzimas de importância biotecnológica tendo em vista que todas as enzimas hidrolíticas avaliadas, apenas a pectinase não foi detectada no estudo.

De acordo com Teixeira (1994), os fungos termotolerantes são grandes produtores de enzimas em elevadas temperaturas; ela observou que espécies fúngicas do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* isolados de serragem em decomposição, amilase, celulase e pectinases, assim contribuindo para o avanço nas pesquisas com microrganismos de isolados em diferentes nichos.

Fernandes (1999) analisou isolados fúngicos do solo da região petrolífera de Urucu-AM, com objetivo de selecionar espécies produtoras de enzimas amilase, celulases, proteases e pectinases, com finalidade de aplicação na indústria de alimentos e de controle ambiental. Esta observou que a maioria das espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* degradaram um ou mais componentes lignocelulósicos.

Em relação às atividades enzimáticas obtidas no presente estudo, a linhagem de *T. harzianum*, cód. 78.1.78, apresentou atividade de 1970,00 UI/L, para atividade de glucoamilase, 36,0 UI/L, 258 UI/L e 43,7 UI/L de atividades FPásica, e α -glicosidásica, respectivamente. As atividades celulásicas em papel de filtro estão cerca de 2,5 vezes superiores aos encontrados por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), que obtiveram atividade de 14 a 17 U/L em seis linhagens de *T. harzianum* naturalmente ocorrentes, isolados de solo de uma reserva em São Paulo. No entanto, em relação à atividade, foram inferiores aos encontrados pelos referidos autores, que encontraram de 350 a 1640 U/L.

O estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2018) relata a importância do manguezal como fonte microbiana, visto a quantidade de micro-organismos isolados obtidos e a capacidade dos mesmos em produzir catalisadores biológicos. Dentre os micro-organismos isolados, a bactéria ANRAS01 pode ser destacada como o de melhor comportamento degradante para meios amilolíticos com IE de 4,6. Nenhum fungo isolado apresentou Índice Enzimático $\geq 2,0$, não sendo, portanto, viáveis economicamente para uso industrial.

Os resultados obtidos aqui apresentam informações preliminares sobre micro-organismos produtores de enzimas de interesse na indústria de alimentos, papel e celulose, têxtil e combustível, destacando-se a importância da realização de estudos futuros para um maior conhecimento sobre a biodiversidade e as funções exercidas por estes microrganismos em diferentes ambientes e de suas interações com fatores bióticos e abióticos dentro de um ecossistema.

Durante a presente pesquisa a maior limitação encontrada foi a carência de profissionais na área de enzimologia na região, entretanto foi contornada com parceria e colaboração para os ensaios pelo Dr. Roberto Maeda egresso da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

4 CONCLUSÃO

A pesquisa traz informação de importância na área de biotecnologia e produção, especialmente para estudos de atividade enzimática, utilizando fungos filamentosos. Foi possível fazer a triagem de várias espécies de fungos isoladas do trato digestivo de larvas de Simuliidae (Insecta: Diptera) e ao final registrar as melhores espécies de fungos secretores de celulase e amilase de interesse comercial. Quanto a atividade enzimática das 37 linhagens fúngicas analisadas foi possível constatar que 60% apresentaram atividade amilolítica e celulolítica. O maior nível de degradação do substrato foi observado para *A. japonicus* (halo= 7 mm, celulase) e *T. harzianum* (halo= 5mm, amilase). Salienta-se a continuidade dos ensaios e uma maior atenção para as espécies fúngicas citadas na literatura e nesta pesquisa como secretoras de celulases e amilases para alvo de estudos no futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/CT/Amazônia (Proc. 553088-2005-0) pelo apoio financeiro. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA/CPEN pelo apoio de recursos humanos e logístico.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Y.B., THELMA, A.V.L., CLIMÉIA, C.S. & HAMADA, N. Stomach content analyses of *Simulium perflavum* Roubaud 1906 (Diptera: Simuliidae) larvae from streams in central Amazônia, Brasil. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*, 96(4):561-576.2001.
- ALENCAR, Y.B., RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M. LICHTWARDT, R.W. & HAMADA, N. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive Tract of Arthropods in Amazonas, Brasil. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*, 98(6):799-810. 2003.
- ARX, J.A. *The genera of fungi Sporulating in pure culture*. 3 ed. J. Cramer, Vaduz, Germany. 215 pp. 1981.
- BAJPAI, P. & BAJPAI, P.K. Application of xylanases in prebleaching of bamboo kraft pulp. *Tappi J.*, 79:225-230. 1996.
- CASSA-BARBOSA, L.A. *Isolamento de fungos endofíticos de Copaifera multijuga e produção de enzimas de interesse biotecnológico por diversos isolados*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, DF. 106pp. 2001.
- DINGLE, J., TEID, W.W. & SOLOMONS, G.L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. *J. Suci. Food Agric.*, 4:145-149. 1953.
- FERNANDES, O.C.C.. Enzimas secretadas por espécies fungicas isoladas do solo da região petrolífera de Urucu-AM, Brasil. *Revista da Universidade do Amazonas, Manaus*, v. 4/5, n. 1/2, p. 29-38, 1999.
- FREDEEN, F.J. Bacteria as food for blackfly larva (Diptera: Simuliidae) in laboratory cultures and in natural streams. *Con. J.Zood.*, 42:527-548. 1964.
- GHOSE, T.K.. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, 59(2):257-268. 1987.
- GUPTA, R., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K & CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*.v.38, Jan. p.1070. 2003.
- HAMADA, N & PETER, H.A. Bionomia e chave para imaturos e adultos de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) na Amazônia Central, Brasil. *Acta amazônica*, 31:109-132, 2001.
- LOZOVEI, A.L.. Diatomáceas (Bacillariophyceae) como alimento das larvas de *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae) no rio Passaúna, Curitiba, Paraná, Brasil. *Arq. Biol. Tecnol* v.32, p. 339-376, 1989.
- MANACHINI, P.L., FORTINA, M.G. & PARTINI, C. Purification of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. Washington, v. 9, n. 3, p. 219- 224, 1987.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31(3):426-428. 1959.
- NOVO NORDISK. Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. A ação das enzimas. Oksanen, T., Pere, J. 2000. *Journal of Biotechnology*, 78:39-48. 1996.

OLIVEIRA, A.N., OLIVEIRA, L.A. ANDRADE, J.S. & JUNIOR, A.F.C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Cienc. Tecnol. Alimentos*, Campinas, 26(4) 853-860, 2006.

OSTERHAGE, C.R. & KAMINSKY, G.M. Ascosalipyrrolone A, an antimicrobial alkaloid from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *J. Org. Chem.* (65): 612-617. 2000.

PANDEY, A., WEBB, C., SOCCOL, C.R & LARROCHE. C. Enzyme Technology. 1^a ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc p.760. 2005.

PEREIRA, E.S., FERREIRA, R.L.M, HAMADA, N. & LICHTWARDT. R.W. Trichomycete Fungi (Zygomycota) Associated with Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae) in Natural and Artificial Habitats in Manaus, AM, Brazil. *Neotropical Entomology*, 34(2): 325-329. 2005.

PZSCZOLA, D.E. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. *Food Technology*, 55:54-62. 2001.

RAIMBAULT, M. & D.ALAZARD. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 9:199-209. 1981.

RUEGGER, J.S. & TAU-K-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. *Rev. Brasil. Bot.* v: 27, p 205- 211. 2004.

RIBEIRO, B. C., GOIS, I. M., FONSECA BISPO, D., J MARQUES, J., & SILVA, C. F. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE COMERCIAL. *Scientia Plena*, 14(2). 2018.

RIDDEL, R.W.. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture *Mycology*. v. 42, p. 265-270. 1950.

SALES, M.S.N., DA COSTA, G.L & PINHEIRO, V.R.E. Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding grounds in the Municipality of seropédica. Rio de Janeiro, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(8): 1107-1110. 2002.

TEIXEIRA, M.F.S. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 85pp. 1994.

VEGA, F.E & DOWD, P.F. The Role of Yeasts as Insect Endosymbionts, In: *Insect-Fungal Associations*. (Ed.) Vega, F.E, Vol. 1. p. 211.2005.