

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/05/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Natália Manuela Strohmayr Lourencetti

“Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol”

Araraquara

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

“Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol”

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientando: Natália Manuela Strohmayer Lourencetti

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Enguita

Araraquara

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L892i

Lourencetti, Natália Manuela Strohmayr

Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: Alvos Inovadores para Descontaminação na Produção de Bioetanol / Natália Manuela Strohmayr Lourencetti. -- Araraquara, 2018.
158 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Francisco Javier Enguita.

1. *Candida tropicalis*. 2. miRNAs. 3. Fermentação Alcólica. 4. XenomiRs. 5. Bioetanol.
I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Enguita, Francisco Javier, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

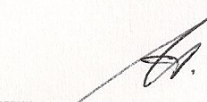
NATÁLIA MANUELA STROHMAYER LOURENCETTI

Investigação de XenomiRs e RNAs de *Candida tropicalis*: alvos inovadores para descontaminação
na produção de bioetanol

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do
título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à
Farmácia

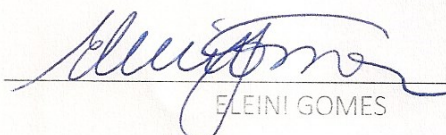
Araraquara, 04 de maio de 2018.

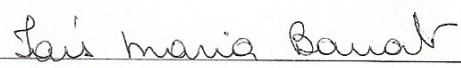
BANCA EXAMINADORA



ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

ELOISA APARECIDA MOCHEUTI KRONKA

DANIEL GUARIZ PINHEIRO

ELEINI GOMES

TAIS MARIA BAUAB

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq – (processo nº 870026/2002-0).

A mulher mais guerreira, mais bonita e mais amável desse mundo, minha MÃE... Que há muitos anos não está mais entre nós e não pode ver nosso crescimento e o legado que por tão pouco tempo deixou guardado em nossos corações e em nossa mente, nos ensinando principalmente o que é respeito, dignidade, educação, humildade e sabedoria. Sei que de onde a senhora estiver, estará vendo mais esta etapa cumprida na minha vida, assim como a realização de um sonho, sei também que estará comigo sempre e que não importa as situações e dificuldades sua garra sempre estará comigo. Este trabalho e esse sonho são pra senhora, por nunca me deixar desistir mesmo de longe e sempre acreditar que podemos ser melhores. Com muito orgulho dedico este trabalho a minha MÃE (Emília in memoriam)
Te amo muito!

Agradeço...

A Deus, obrigada Pai por mais esta etapa e mais uma realização de um sonho realizado em minha vida, primeiramente agradeço ao Senhor por tudo, por todas as vezes que orei baixinho pedindo a força e paciência, pelos agradecimentos a cada graça recebida e por não desistir e estar comigo sempre. Que seu Espírito Santo esteja comigo sempre, e que as pedras no caminho, sejam obstáculos de aprendizado e vitória. Guia-me e guardai-me sempre.

“Você diz: ‘Isso é impossível’, Deus diz: ‘Tudo é possível’ (Lucas 18:27); Você diz: ‘Não vou conseguir’, Deus diz: ‘Eu suprirei todas as suas necessidades’ (Filipenses 4:19); Você diz: ‘Estou com medo’, Deus diz: ‘Eu não te dei um espírito de medo’ (II. Timóteo 1:7); Você diz: ‘Eu não posso fazer’, Deus diz: ‘Você pode fazer tudo’ (Filipenses 4:13); Você diz: ‘Não tenho condições’, Deus diz: ‘Minha graça é suficiente’ (II. Coríntios 12:9); Você diz: ‘Não vale a pena’, Deus diz: ‘Tudo vale a pena’ (Romanos 8:28)”

A minha família, que sem ela hoje não seria nada, a base da minha vida, minha alegria, minha paz. A meu avô o homem mais guerreiro que conheci que é muito mais que um avô, é um pai, um super-herói, sempre me mostrando o melhor caminho e o que é ser digno, pessoa de muitos valores que com certeza neste trabalho tem um pedacinho de cada um deles, que me ele me ensina todos os dias, com seu jeito único. A minha tia que é mais que uma tia, uma mãe, sem ela não seria capaz de ter tanta força pra passar pelos obstáculos, uma companheira, uma amiga que me escuta reclamar, chorar, gritar a frente dos obstáculos, e rir e comemorar comigo a cada etapa cumprida neste trabalho, sempre me mostrando o lado bom de cada situação e me acalmando. A minha irmã, meu cunhado e meu sobrinho Felipe.

As minhas segundas famílias que ganhei de presente de Deus, família Meneguel, minha irmã de coração Mari Meneguel, mãe, pai e João. Família Mendes que hoje está em São Paulo, Salete, Sofia, Helena (minha afilhada) e Telmo. Que ambas sempre estavam com um sorriso no rosto, quando aparecia triste com as dificuldades, sempre me escutando e me mostrando que tudo é uma fase e faz parte as dificuldades, mas que a vitória sempre vem e que eu era capaz. Nunca deixaram de acreditar em mim, sempre me colocando alegria e sorriso no rosto. Companheiros fiéis, famílias que Deus deu a mim de presente, obrigada por fazerem parte da minha vida e ajudarem a concretizar cada etapa desse trabalho.

“Casa e uma construção de cimento e tijolos, Lar e uma construção de valores e princípios e a maneira mais linda que Deus usa para te fazer feliz e dando-lhe uma Família!”

A minha amiga mais fiel Mari Galeani, uma irmã, uma companheira de trabalho, um espelho, que sempre que precisei estava presente para me ajudar sempre, mesmo que com um simples abraço, uma palavra de força, uma verdade. Com quem dividi as dificuldades e as alegrias desse trabalho e da vida. Amiga que levo para sempre comigo e que tenho certeza que estará até o fim comigo seja o caminho que for seguir me dando forças e comemorando sempre comigo.

A minha orientadora, Ana Marisa profissional competente e pessoa amiga, que a convivência me ensinou a admirar e respeitar. Agradeço pelo constante estímulo e confiança, por oferecer as melhores condições para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade constituída no decorrer destes anos. Muito obrigada!

À professora Maria José, por acreditar em meu potencial e permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa e por ser um exemplo de profissional, além de ser humano excepcional.

À Micologia – Proteômica que por mais difícil que o dia estivesse, tinha sempre alguém para te tirar um sorriso, dar uma força e compartilhar os obstáculos. Amigos que conquistei durante a minha caminhada: Rosângela, Rosemira, Junya, Fer Gullo, Nayla, Cláudia, Laranja, Lili, Haroldo, Panta, Priscila, Carol T., Suelen, Carol MG, Marina, Rodrigo, Jaqueline, Kayla, Mônica, Paulo e Vanessa. Saibam que cada um de vocês me ensinou uma coisa boa, e com certeza não só no meu trabalho, mas na vida vocês serão sempre um pedacinho do meu amadurecimento. Contem comigo sempre.

“Abençoados os que possuem amigo, os que têm sem pedir, porque amigo não se pedi, não se compra, não se vende, amigo a gente ganha!” – Machado de Assis

Ao professor Francisco Enguita (Paco) meu co-orientador que estive sempre dispostos a ajudar e colaborar para a conclusão deste trabalho.

A CNPq pelo apoio financiamento.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Acredito que ninguém consegue nada sozinho e que sempre existem em nossas vidas pessoas especiais e passantes que não menos importantes, nos ajudam a trilhar nossos caminhos. E cabe a nós agradecermos e quando possível e necessário ajudar, assim como fomos ajudados.

Muito obrigada!!!

“O único Sucesso que vale a pena, é aquele que nos dá o direito de no final do dia deitar a cabeça no travesseiro e você dormir feliz, sabendo que você foi o ser humano que você poderia ter sido” Pe. Fábio de Mello.

RESUMO

O processo de fermentação é amplamente utilizado em usinas brasileiras para produção de bioetanol e, mesmo sendo um processo amplamente difundido, a problemática sobre contaminações por micro-organismos ainda é uma incógnita. Problemas de redução de produtividade estão diretamente ligados à competição de nutrientes quando há decorrentes crises de contaminações por bactérias e leveduras não-*Saccharomyces*. Entre as leveduras contaminantes mais encontradas estão as pertencentes aos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Komagataella* e *Schizosaccharomyces*. Muitos antimicrobianos são utilizados para combater contaminações, porém com baixas especificidade e eficiência para leveduras contaminantes. O desenvolvimento de novas alternativas para a descontaminação do processo fermentativo e a busca por biomoléculas naturais e não geradoras de resíduos tóxicos, são emergenciais. Tais biomoléculas podem ser originárias dos miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA não codificantes que afetam a estabilidade dos RNAs mensageiros, atuando na expressão de transcritos dentro de processos biológicos, afetando controles transcricionais e pós-transcricionais, resultando na inibição ou potencialização da ação gênica nos processos biológicos fermentativos. Dessa forma, miRNAs livres na dorna de fermentação podem interferir de maneira controlada os contaminantes que competem com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de bioetanol. Em estudos anteriores de nosso grupo foi selecionada e estudada uma linhagem contaminante de *Candida tropicalis*, isolada de usina da região de Araraquara/SP, que perseverou durante o período de uma safra. Assim, como continuidade, nosso estudo visou elucidar o comportamento metabólico e transcricional do contaminante relevante, *C. tropicalis*, durante ciclo de fermentação, através de técnicas de capacidade fermentativa, sequenciamento do RNA global e identificar genes alvos para o desenvolvimento de miRNAs como biomoléculas antifúngicas pela triagem de miRNAs específicos da cana de açúcar em amostras do contaminante *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* (PE-2) e do caldo de cana (células da planta). Posteriormente, analisar *in silico* a presença destes genes/alvos identificados em outras espécies de leveduras contaminantes. Para tanto foram realizados estudos de capacitação fermentativa como testes de viabilidade celular (*Live/Dead*), atividade metabólica (XTT), estudos de assimilação de açúcares (sacarose, glicose e frutose) e produção de etanol por HPLC do contaminante *C. tropicalis* com a levedura *S. cerevisiae* (PE-2) para verificar o comportamento competitivo desse contaminante. Assim, os resultados mostraram que a viabilidade do contaminante foi maior que da levedura PE-2 (94% e 81%, respectivamente), em um período de 8 horas de fermentação. A atividade metabólica e assimilação dos açúcares foram equivalentes, mas, para produção de bioetanol foi observado que ambas as linhagens produziram bioetanol ao final de 8 horas, porém, a contaminante de forma significativamente reduzida. Para estudar o comportamento transcricional da contaminante frente à fermentação alcoólica foi realizado sequenciamento de RNA global (*RNAseq-MiSeq*) e os resultados mostraram um número de genes significativamente expressos, tanto reprimidos quanto induzidos relacionados ao processo de fermentação, como transporte de açúcares, piruvato descarboxilase, metabolismo de aminoácidos, membrana, resistência e também processos ligados à transcrição, evidenciando que a levedura contaminante utiliza toda uma maquinaria de vias fermentativas, para produzir bioetanol. Para o desenvolvimento das biomoléculas antifúngicas foram realizados testes de RT-PCR, através de uma triagem de 25 miRNAs de cana de açúcar, frente a amostras de RNA total do contaminante *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e do caldo de cana, retiradas durante a fermentação de 8 horas, afim de elucidar interações importantes no processo fermentativo. Os resultados mostraram 11 miRNAs significativamente expressos, confirmando que interações genéticas através de miRNAs podem ocorrer entre espécies de reinos diferentes. Sendo assim, suas funções foram caracterizadas *in silico* e por esses resultados, foi realizada a busca de genes/alvos pelo *software* RNA22. Os dados analisados mostraram que 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 e sof-miR156) interagiram com 6 genes/alvo (CTRG_00017, CTRG_06114, CTRG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 e CTRG_03746). Duas interações específicas para *C. tropicalis* foram identificadas por dois miRNAs (sof-miR159a e sof-miR156) com três genes/alvos (CTRG_06114, 0416 e 03746). Assim, os seis genes/alvos identificados *in silico* exibiram por meio do programa *Blast* alta homologia para *C. tropicalis* e para diferentes gêneros de leveduras contaminantes não-*Saccharomyces*. Essa interação foi com aproximadamente 36 diferentes espécies de leveduras potenciais contaminantes de diversos ecossistemas. E por fim, os quatro miRNAs identificados não mostraram interação *in silico* com os genes de *S. cerevisiae*, portanto poderiam ser utilizados como biomoléculas antifúngicas potenciais para o controle da contaminação de dornas de fermentação para a produção de bioetanol.

Palavras chave: *Candida tropicalis*; miRNAs; Fermentação Alcoólica; XenomiRs; Bioetanol

ABSTRACT

The fermentation process is widely used in Brazilian plants for the production of bioethanol and, even though it is a widely diffused process, the problem of contamination by microorganisms is still unknown. Productivity reduction problems are directly linked to nutrient competition when there are bouts of contamination by bacteria and non-*Saccharomyces* yeasts. Among the most common contaminating yeasts are those belonging to the genera *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Komagataella* and *Schizosaccharomyces*. Many antimicrobials are used to combat contamination, but with low specificity and efficiency for contaminating yeasts. The development of new alternatives for the decontamination of the fermentative process and the search for natural biomolecules and non-toxic wastes are emergency. Such biomolecules may originate from the miRNAs, which are small molecules of non-coding RNA that affect the stability of messenger RNAs, acting on the expression of transcripts within biological processes, affecting transcriptional and post-transcriptional controls, resulting in the inhibition or potentiation of the gene action fermentative biological processes. Thus, free miRNAs in the fermentation dorna can interfere in a controlled manner the contaminants that compete with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the production of bioethanol. In previous studies of our group, a contaminant strain of *Candida tropicalis*, isolated from a plant in the region of Araraquara/SP, was selected and studied, which persevered during the period of one harvest. As a continuity, our study aimed to elucidate the metabolic and transcriptional behavior of the relevant contaminant, *C. tropicalis*, during the fermentation cycle, through fermentative capacity techniques, sequencing of global RNA and to identify target genes for the development of miRNAs as antifungal biomolecules by the screening of sugarcane-specific miRNAs in samples of contaminant *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* (PE-2) and broth of cane (plant cells). Subsequently, in silico analysis the presence of these genes / targets identified in other species of contaminating yeasts. For this purpose, fermentation training studies were performed, as well as cell viability tests (Live / Dead), metabolic activity (XTT), sugar assimilation studies (sucrose, glucose and fructose) and ethanol production by HPLC of *C. tropicalis* contaminant yeast *S. cerevisiae* (PE-2) to verify the competitive behavior of this contaminant. Thus, the results showed that the viability of the contaminant was higher than that of the PE-2 yeast (94% and 81%, respectively), in a period of 8 hours of fermentation. The metabolic activity and assimilation of sugars were equivalent, but for bioethanol production it was observed that both strains produced bioethanol at the end of 8 hours, but the contaminant significantly reduced. To study the transcriptional behavior of the contaminant against alcoholic fermentation, RNA sequencing (RNAseq-MiSeq) was performed and the results showed a number of significantly expressed genes, both repressed and induced related to the fermentation process, such as sugar transport, pyruvate decarboxylase, amino acid metabolism, membrane, resistance and also processes related to transcription, evidencing that the yeast contaminant uses a whole machinery of fermentation routes, to produce bioethanol. For the development of the antifungal biomolecules, RT-PCR tests were performed, through a screening of 25 sugarcane miRNAs, against samples of total RNA from the contaminant *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* and cane juice, collected during the fermentation of 8 hours, in order to elucidate important interactions in the fermentation. The results showed 11 significantly expressed miRNAs, confirming that genetic interactions through miRNAs can occur between species of different kingdoms. Therefore, its functions were characterized in silico and by these results, the search of genes / targets by the software RNA22 was performed. The analyzed data showed that 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 and sof-miR156) interacted with 6 genes/target (CTRG_00017, CTRG_06114, CTRG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 and CTRG_03746). Two interactions specific for *C. tropicalis* were identified by two miRNAs (sof-miR 159a and sof-miR156) with three genes / targets (CTRG_06114, 0416 and 03746). Thus, the six genes / targets identified in silico exhibited through the Blast program high homology to *C. tropicalis* and to different genera of non-*Saccharomyces* contaminating yeasts. This interaction was with approximately 36 different species of potential yeast contaminants from several ecosystems. Finally, the four identified miRNAs showed no in silico interaction with the *S. cerevisiae* genes, so they could be used as potential antifungal biomolecules for the control of contamination of fermentation dams for the production of bioethanol.

Keys words: *Candida tropicalis*; miRNAs; Alcoholic Fermentation; XenomiRs; Bioethanol

LISTA DE ABREVIATURAS

- %: Porcentagem
- +: Simbologia Numérica de Positivo
- ≥: Símbolo de Maior ou Igual
- ®: Simbologia de Marca Registrada
- °C: Graus Celsius
- µL: microlitro
- 3': Região da Extremidade Inicial da Fita de RNA
- 5': Região da Extremidade Final da Fita de RNA
- AGO: Família de Proteínas Argonautas
- atm: Simbologia de Pressão Relativa
- C4: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*
- C0: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*, amostra 0 hora
- C8: Identificação da amostra do contaminante *Candida tropicalis*, amostra 8 horas
- CC: Identificação da Amostra de Cana de Açúcar
- CD-CUTs: Cytoplasmically Degraded Cryptic Unstable Transcripts
- cDNA: DNA complementar na síntese do RNA mensageiro
- céls/mL: Células por mililitro
- CRYSP: Clustered interpaced regularmente repetições palindrômicas curtas
- ct: Limiar do Ciclo de PCR
- CUTs: Cryptic Unstable Transcripts
- DCL1: Dicer-like – Proteína Nuclear
- DEPC: Reagente Dietil Pirocarbonato
- DGCR8: *Di George Syndrome Critical Region 8 Protein*
- DICER: Enzima Nuclease III
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- DROSHA: Enzima Ribonuclease III
- dsRNA: RNA Fita Dupla
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Exp5: Proteína Exportina 5
- g/L: Gramas por litro
- g: Gramas
- h: Hora
- H₂O: Símbolo Químico da Água
- HASTY: Proteína Transportadora
- HEN1: Hua Enhancer 1 – Enzima de Metilação
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
- HYL1: Hiponastic Leave 1 – Proteína Nuclear
- kpb: Peso Molecular
- P0: Identificação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amostra 0 hora
- P8: Identificação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amostra 8 horas
- lcrnAs: RNA não Codificantes Longos
- miRBase: Banco de Dados de miRNAs
- miRNA: microRNA

- mL: mililitro
- mM: micro Molaridade
- mRNA: RNA mensageiro
- MUTs: Meiotic Unannotated Transcripts
- ncRNAs: RNAs não codificantes
- ng/μL: nanogramas por microlitro
- nm: Comprimento de onda- nanômetro
- PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato
- piRNAs: PIWI – interatives RNAs
- PIWI: Família De Proteínas De Interação Gênica
- Pol III: Enzima Polimerase III
- pre-miRNA: pré- microRNA
- pri-miRNA: Transcritos Primários na Biogênese dos miRNAs
- pta: *Pinus taeda*
- RIN: Número da Integridade do RNA
- RISC: Complexo Citoplasmático Composto pelo RCL + AGO
- RLC: Complexo de Ligamento de pre-miRNAs
- RNA: Ácido Ribonucléico
- RNA-seq: Sequenciamento de RNA
- rpm: Rotação por Minuto
- RPMI: Meio Tamponado de MOPS + Glicose
- rRNA: RNA ribossomal
- RT-PCR: Reação da Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase
- SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
- SERRATA: Proteína Nuclear
- siRNAs: small – intefering RNAs
- sof: *Saccharum officinarum*
- ssp: *Saccharum ssp*
- ssRNA: RNA Fita Simples
- SUTs: Stable Unannotable Transcripts
- TAE: Tampão de EDTA + Acetato de Sódio
- TERRAs: Telomeric Repeat Association Cryptic ncRNAs
- UniSp3 IPC: Calibrador da placa de RT-PCR
- UniSp6: Primer Controle Endógeno
- v: Voltagem
- x: Simbologia de multiplicação
- XTT: Ensaio Colorimétrico composto de Sal de Tetrazólio
- XUTs: xrn-1- sensitive Unstable Transcripts
- Y-12632: Identificação Taxonômica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*
- YEPD: Meio de Cultura composto de extrato de levedura, peptona A e dextrose
- β: Identificação da letra Grega Beta
- Δ: Símbolo da letra Grega Delta
- °Brix: Escala Numérica de Índice de Refração

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da produção e percentual de produção por continente: Américas: América do Sul - Brasil 43% (cana); América do Norte: EUA 44% (milho) e Canadá 2%; Europa 3% (legumes e trigo); África 1% e Oceania 1%.....	3
Figura 2: Esquema simplificado do funcionamento de uma usina sucroalcooleira no processo batelada, com umas suas principais fases para produção de açúcar e bioetanol.....	5
Figura 3: Representação esquemática das metodologias utilizadas em nosso estudo e suas Ciências.....	24
Figura 4: Representação esquemática da retirada das amostras (em tempo) das duas linhagens PE-2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) e C4 (<i>Candida tropicalis</i>) no ensaio de fermentação alcoólica.....	27
Figura 5: Esquema de distribuição dos miRNAs da cana de açúcar nas placas comerciais (<i>Pick-&-mix microrna pcr panel, 96 well ready-to-use (mi), vii7, Exiqon, Vedbaek, Dinamarca</i>) para o Screening, RT-PCR e análise dos miRNAs.....	36
Figura 6: Ensaio de Viabilidade Celular – <i>Live/Dead®</i>	39
Figura 7: Imagens da Viabilidade Celular – <i>In Cell Analyser</i> , objetiva de 20x.....	40
Figura 8: Concentração da atividade metabólica das linhagens de leveduras <i>Candida tropicalis</i> (C4) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2) pelo ensaio de XTT.....	42
Figura 9: Cinética de assimilação de sacarose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8 horas.....	43
Figura 10: Cinética de assimilação de glicose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8 horas.....	43
Figura 11: Cinética de assimilação de frutose por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8 horas.....	44
Figura 12: Cinética de produção de etanol, em quantificações por ensaio de HPLC, das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>Candida tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h e 8 horas.....	45
Figura 13: Eletroferograma das amostras mostrando qualitativamente e quantitativamente a Integridade de RNA.....	48
Figura 14: <i>Heatmap</i> dos 30 principais genes diferencialmente expressos.....	50
Figura 15: Quantificação do processo biológico de genes diferencialmente expressos induzidos e reprimidos.....	51
Figura 16: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4)	60
Figura 17: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	61
Figura 18: <i>Volcano Plot</i> dos perfis de miRNAs detectados nas amostras agrupadas do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) quanto da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	62
Figura 19: Rede de interação dos possíveis alvos de miRNAs diferencialmente expressos nas amostras C0, C8, P0 e P8 com genes diferencialmente expressos nos sequenciamento (RNA-Seq) do contaminante <i>C. tropicalis</i>	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais antimicrobianos, tipo e mecanismo de atuação destes compostos utilizados nas usinas sucroalcooleiras....	13
Tabela 2: Quantificações e purezas das extração de RNA das amostras do caldo de cana de açúcar (CC), contaminante <i>C. tropicalis</i> (C4) nos tempos de 0 e 8 horas (C0 e C8) e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2), nos tempos de 0h, 4h e 8h (P0 e P8).....	47
Tabela 3: Quantificação e dos top 100 genes selecionados para reprimidos e induzidos e suas classificações funcionais referentes ao processo de fermentação alcoólica das amostras C0 / C0 e C8 / C8 com valor de fold change > 2 e < -2, bem como p-valor de < 0,01.....	49
Tabela 4: Identificação nominal, espécie e sequência gênica dos 25 miRNAs de cana de açúcar selecionados para os ensaios de RT-PCR.....	56
Tabela 5: miRNAs diferencialmente expressos, com valores de fold change normalizados e em log ² de todas as condições individualmente analisadas das amostras do contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4): CC-C0, CC-C8 e amostras das levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2): CC-P0, CC-P8. Análises das amostras agrupadas, contaminante <i>C. tropicalis</i> (C4): C0-C8 e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2): P0-P8.....	58
Tabela 6: Funções dos miRNAs diferencialmente expressos no RT-PCR nas amostras C0, C8, P0 e P8, para as condições individuais CC-C0, CC-C8, CC-P0 e CC-P8 obtidas pelo software <i>psRNA Target: A Plant Small.RNA Target Analysis</i>	63
Tabela 7: Identificação dos possíveis alvos de miRNAs e seu gene alvo de interação, obtidos pelo software RNA22, através da análise de expressão do RT-PCR para os miRNAs e sequenciamento de RNA (RNA-seq) para os genes, das amostras C0 e C8.....	66
Tabela 8: Identificação da homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_00017 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, obtidos pelo programa <i>Blast</i>	71
Tabela 9: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_06114 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	72
Tabela 10: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_01887 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	72
Tabela 11: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_05408 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	73
Tabela 12: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_04160 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	74
Tabela 13: Identificação de homologia e porcentagem de identidade entre o gene alvo CTRG_03746 com diferentes espécies de micro-organismos, contaminantes e não contaminantes de usinas sucroalcooleira para produção de bioetanol, pelo programa <i>Blast</i>	75

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – TESE	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Representação Esquemática	22
3.2. Micro-organismos	25
3.3. Descontaminação do Caldo de Cana de Açúcar	25
3.4. Fermentação Alcolólica	25
3.4.1. Escalonamento Celular	25
3.4.2. Ciclos de Fermentação Alcolólica	26
3.4.3. Viabilidade Celular – <i>Live Dead - Yeast</i> [®]	27
3.4.4. Atividade Metabólica – XTT	28
3.4.5. Assimilação de Açúcares e Produção de Etanol – HPLC	29
3.5 Transcriptoma	30
3.5.1. Extração de RNA da cepa contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) e da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	30
3.5.2. Quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA das amostras (C4 e PE-2)	31
3.5.3. Construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA) – <i>Candida tropicalis</i> (C4)	31
3.5.4. Clusterização e sequenciamento (<i>MiSeq</i>) das amostras de <i>Candida tropicalis</i> (C4)	32
3.5.5. Análise dos dados de sequenciamento das amostras de <i>C. tropicalis</i> (C4)	33
3.5.5.1. Qualidade, Limpeza, Quantificação e Normalização dos Dados	33
3.5.5.2. Análise Diferencial da Expressão Gênica	34
3.5.5.3. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos	34
3.5.5.4. Análise de Enriquecimento: Ontologia dos Dados da Expressão Gênica	34
3.6. miRNAs	35
3.6.1. Triagem de miRNAs validados em espécie de cana de açúcar (<i>Saccharum ssp.</i> e <i>Saccharum officinarum</i>)	35
3.6.2. Obtenção do RNA total, quantificação e avaliação da integridade	35
3.6.3. Síntese de cDNA – miRNAs	35
3.6.4. Expressão dos miRNAs por RT-PCR	35
3.6.5. Análise de Dados e Bioinformática – miRNAs	36
3.6.5.1. Identificação Funcional dos miRNAs	37
3.6.5.2. Análise Interação miRNA-Gene/Alvo	37
3.6.5.3 Rede de Interação miRNA- Gene/Alvo	37
3.6.5.4. Alinhamento Gênico de <i>Candida tropicalis</i> e micro-organismos contaminantes e não-contaminantes	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Fermentação Alcolólica	38
4.1.1. Escalonamento Celular	38
4.1.2. Ciclos de Fermentação Alcolólica	38
4.1.3. Viabilidade Celular – <i>Live/Dead- Yeast</i> [®]	39
4.1.4. Atividade Metabólica – XTT	41
4.1.5. Assimilação de Açúcares e Produção de Bioetanol	42
4.2. Extração de RNA das amostras de contaminante <i>Candida tropicalis</i> (C4) e levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2)	46
4.3. Transcriptoma	48
4.3.1. Dados do Sequenciamento e Mapeamento do genoma de <i>Candida tropicalis</i>	48
4.3.2. Análise Diferencial da Expressão Gênica das amostras de <i>Candida tropicalis</i>	48
4.3.3. Análise das Enriquecimento das amostras de <i>Candida tropicalis</i> – Gos	50

4.4. miRNAs.....	55
4.4.1. miRNAs – Cana de Açúcar.....	55
4.4.2. <i>DataAssist</i>	56
4.4.3. Funções dos miRNAs Diferencialmente Expressos: <i>psRNA Target s Plant Small RNA Target Analysis</i>	63
4.4.4. Predição de Alvos miRNAs – miRNA-Gene/Alvo.....	66
4.4.5. Alinhamento Gênico de <i>Candida tropicalis</i> e micro-organismos contaminantes e não contaminantes: <i>Blast</i>	70
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
Anexo I: Dados de Expressão da placa de caldo d cana de açúcar, evidenciando a expressão dos 25 miRNAs selecionados	96
Anexo II: Sequências Gênicas dos possíveis alvos encontrados na Interação miRNA-gene/alvo, utilizados pelo programa <i>Blast</i> para os alinhamentos.....	101
CAPÍTULO 2 – ARTIGOS	110

1. INTRODUÇÃO

No último século, as recorrentes crises no petróleo mundial resultaram em graves crises econômicas, levando a busca de combustíveis alternativos. No Brasil as consequências foram severas devido a dependência do país, que importava cerca de 85% de seu consumo total (Manual de Recomendações, 1990).

Em 1930, o Brasil apresentou o primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool que visava estabelecer a infraestrutura para a produção e a utilização do bioetanol (Moreira *et al.* 1996), resultando para o país, o início de suas atividades na produção desse combustível no século XX (Amorim *et al.*, 2011).

O bioetanol tinha sua produção centralizada, levando assim a uma quantidade inferior de produção para o consumo totalitário, quando comparado com a utilização dos combustíveis derivados do petróleo, levando o Brasil ainda a se colocar em dependência do petróleo para suprir o consumo do país (Macedo, 2008).

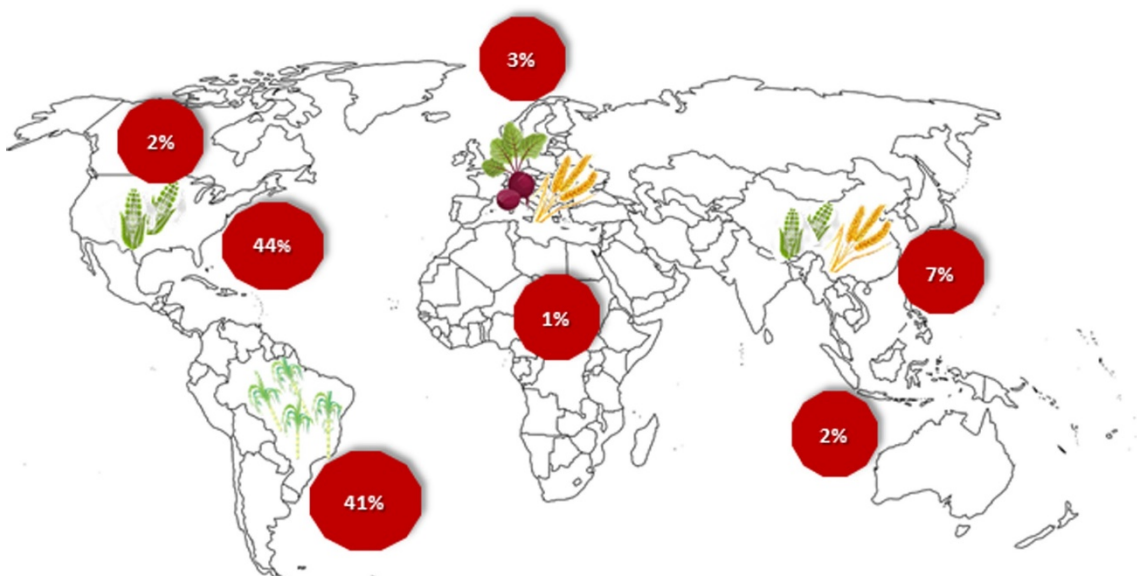
Diante da situação de baixa produtividade, o governo nacional anuncia o lançamento do Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), na década de 70, visando estimular a produção de bioetanol, para garantir a demanda de mercado externo e interno de um novo combustível, que além de acarretar positivamente a economia do país, contribuía para a redução de problemas ambientais provenientes da produção de derivados do petróleo, estabelecendo um novo comportamento para a qualidade do ar e também de desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, como tecnologias na área de alternativas energéticas (Zanin, 2000).

O ProÁlcool representou o maior aumento da produção de bioetanol, passando de 500 milhões de litros no início do programa para cerca de 13 bilhões de litros por ano a partir do seu lançamento (Zanin, 2000). Desde então, o Brasil é caracterizado como o pioneiro e mais competitivo produtor de bioetanol a partir da matéria prima cana de açúcar, e com uma política interna de consumo bem desenvolvida (Goldemberg, 2008; Amorim *et al.*, 2011).

Atualmente, o Brasil possui uma estimativa de produção com a safra 2017/2018 de 635,6 milhões de toneladas de cana de açúcar, sendo 39,46 milhões de toneladas de açúcar, 27 bilhões de litros de bioetanol (11,18 bilhões para etanol anidro e 15,87 bilhões para etanol hidratado de litros) como aponta os dados da Campanha Nacional de Abastecimento CONAB (Conab, 2018). Desde 1986 toda a produção de bioetanol é proveniente da cana de açúcar, representando uma tecnologia de larga escala com aumento anual caracterizado pelo desenvolvimento de novas variedades dessa planta associadas às novas tecnologias agrícolas (Zanin, et al., 2000; Amorim, et al., 2005; Amorim et al., 2011).

As três maiores potências mundiais na produção de bioetanol são o Brasil (cana-de-açúcar), EUA (milho) e China (trigo e milho), sendo as duas últimas pela produção através de grãos. Estimativas indicam que cerca de 85% do bioetanol mundial é de responsabilidade da produção brasileira e norte-americana, além de produções inferiores em todos os continentes, como mostra a figura 1 (Beltrame et al, 2016).

Figure 1: Distribuição global da produção e percentual de produção por continente: Américas: América do Sul - Brasil 43% (cana de açúcar); América do Norte: EUA 44% (milho) e Canadá 2%; Europa 3% (legumes e trigo); África 1% e Oceania 1%.



A cana de açúcar utilizada para a produção de bioetanol é derivada de aproximadamente 637 espécies conhecidas como: gramíneas perenes altas do

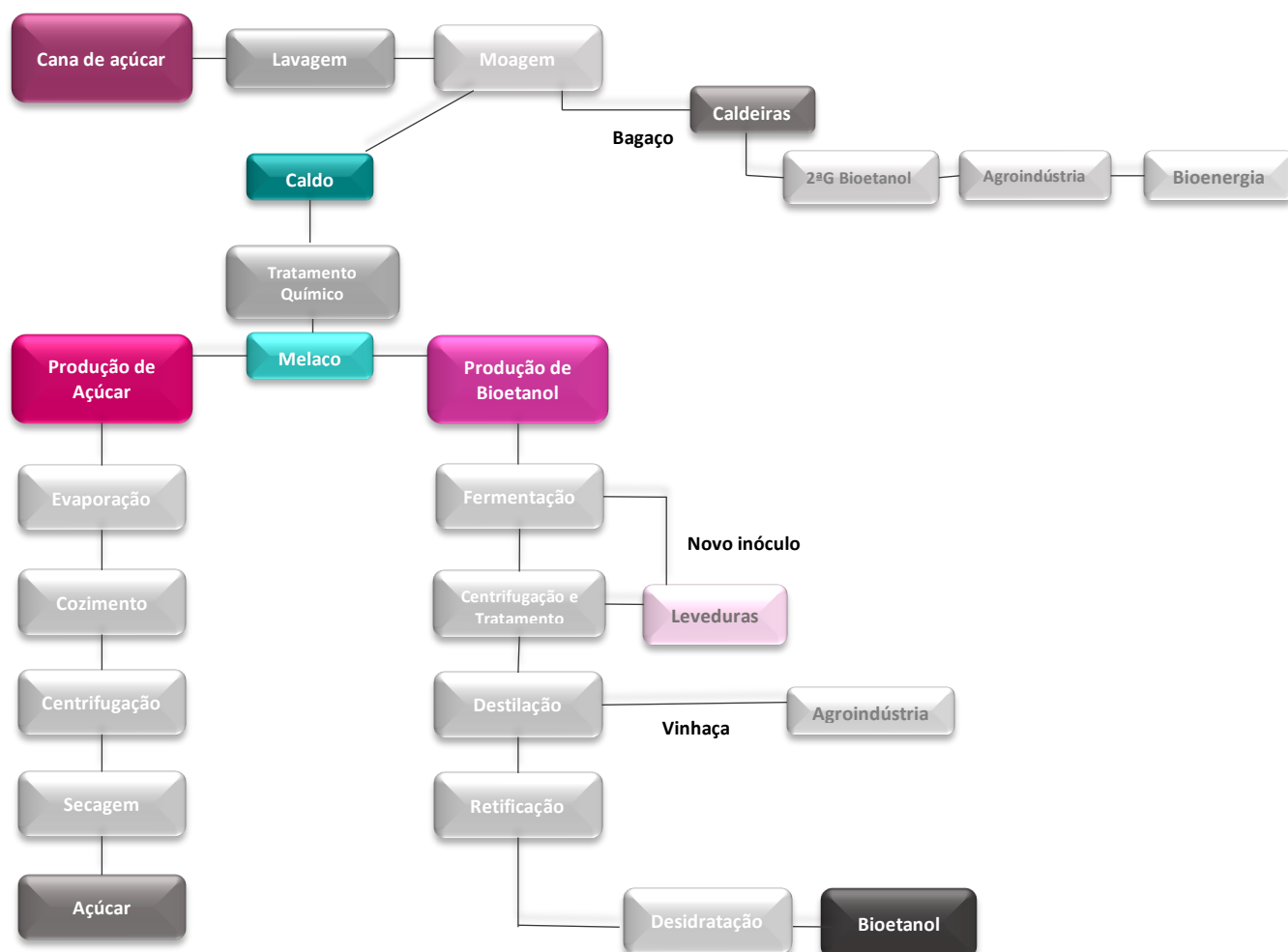
reino *Plantae*, gênero *Saccharum spp*, família *Poaceae*, nativa de clima temperado quente, sendo sua morfologia composta de haste e palha (Paes et al., 2005; Canilha et al., 2012). Rotineiramente as usinas sucroalcoleiras cultivam híbridos derivados de cruzamentos principalmente entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* (Dillon et al., 2007).

A produção sucroalcooleira brasileira é derivada de uma fonte de dissacarídeo, proveniente da extração do caldo da cana de açúcar, a sacarose. A fermentada é o conjunto de micro-organismos, em especial leveduras, para ao final do processo fermentativo resultar na produção do bioetanol e seus subprodutos (Brow, et al., 2013).

O processo fermentativo é conhecido desde a antiguidade, sendo caracterizado como um processo bioquímico e biológico complexo, que tem como objetivo a ilação do açúcar a álcool etílico (anidro e hidratado), gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis e ésteres (Oliveira, 1960).

O processo de fermentação brasileiro atualmente utilizado é conhecido como batelada, encontrado em cerca de 70% das usinas, no qual ocorrem curtos ciclos de fermentação (6 a 10 horas) e tratamento celular com ácido sulfúrico ao final de cada ciclo, como mostra a figura 2 (Lopes, et al., 2016). Essa etapa constitui a chave principal do processo batelada, tendo como objetivo principal minimizar os riscos de contaminação e ainda assim, utilizar essa biomassa celular tratada como novo inóculo para posteriores ciclos fermentativos. Este tratamento celular é repetido durante toda safra anual no período de 6 a 9 meses (Brow, et al., 2013).

Figura 2: Esquema simplificado do funcionamento de uma usina sucroalcooleira no processo batelada, com suas principais fases para produção de açúcar e bioetanol.



No processo de fermentação, o suco da cana extraído da moagem é utilizado como a matéria prima, misturado à água e micro-organismos, obtendo como produto final um bioetanol de 9 a 12 % (v/v) (Andrietta et al., 2007; Basso, et al., 2008; Pereira et al., 2012; Babrzadeh et al., 2012). Atualmente, o micro-organismo mais utilizada no setor sucroalcooleiro é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ssp. em razão de sua diversidade e adaptação a diferentes condições do meio durante todo o processo fermentativo (Liti et al, 2009).

Com o avanço da produção nacional de bioetanol, em meados dos anos 90, era usual utilizar leveduras de indústria de panificação como inóculo de partida onde, ela conferia ao processo fermentativo vantagens como rápida

atividade, e baixo índice de problemas no rendimento durante a fermentação, constituindo para a época, a melhor escolha (Amorim et al, 2011).

Quanto a este tipo de fermento, a grande mudança ocorreu quando os estudos microbiológicos avançaram e constataram que as leveduras utilizadas como partida inicial, eram grandemente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra, levando então aos produtores a informação de que, as únicas leveduras que possuíam a capacidade de sobreviver em todos os ciclos até o final, eram as isoladas nativas (isoladas da própria usina). Estas eram provenientes de safras anteriores e no momento da centrifugação, tratamento e reutilização eram utilizadas como novo inóculo. Assim, nos anos 90 começava a propagação das próprias linhagens de leveduras nas usinas brasileiras. (Basso et al, 1993).

Um trabalho pioneiro nesse ramo de propagação de leveduras ocorreu acidentalmente pelo professor Jayme Rocha de Almeida (ESALQ-USP) nos anos 50, onde ao colocar a mão em uma dorna de fermentação em que fermentava uma levedura importada e posteriormente as limpar em um lenço, que carregava consigo, despropositadamente deu o início ao método de propagação de leveduras nativas. Mais tarde em seu laboratório, ao isolar o que tinha da amostra, verificou que não se tratava mais da levedura importada e sim de duas linhagens nativas, denominadas de IZ 1830 e IZ 1940 (Amorim et al, 2005).

Esse processo durou pouco tempo, visto que a propagação em larga escala dessas leveduras era um meio que apresentava dificuldades, desestimulando os produtores, revertendo a fermentação para a partida com leveduras de indústrias de panificação. Atualmente esse processo é bem estabelecido, fornecendo as usinas, biomassa em larga escala de leveduras nativas isoladas de suas próprias usinas (de onde ocorre a derivação da nomenclatura da levedura) e de seu próprio processo fermentativo, como as conhecidas leveduras da espécie *S. cerevisiae*: PE-2 (Usina da Pedra), SA-I (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), BG 1 (Usina Barra Grande), entre outras (Andrietta et al, 1997).

Embora o processo de produção de bioetanol da primeira geração seja muito difundido no Brasil, ele ainda apresenta condições avessas e emergentes, principalmente referente à esterilidade, levando a importantes quadros de contaminações microbianas durante o processo (Basso et al, 2011).

Na fermentação o ambiente industrial é complexo, caracterizado por um bioma diversificado de micro-organismos. Desta forma, é importante a compreensão desse ecossistema industrial, bem como, dos nichos que são criados durante um novo processo. Por outro lado, estes micro-organismos devem ser identificados, pois podem atuar como contaminantes interferindo de modo negativo todo o processo de fermentação (Costa et al, 2015).

As contaminações podem derivar do solo, planta, práticas agrícolas, extração e equipamentos industriais, destacando o fato de que os micro-organismos contaminantes mais encontrados são os que normalmente habitam a microbiota do solo da plantação da cana de açúcar (Bassi et al, 2013; Ward, 1991).

No momento da colheita da planta existe a atividade de corte (manual ou mecânico) e posteriormente o armazenamento desta para a coleta. Nesse momento essas plantas podem entrar em contato com o solo e através das fissuras do corte, esses micro-organismos contaminantes habitantes do solo podem entrar, invadir e colonizar os tecidos vegetais (de Souza et al, 2016).

Assim uma planta de cana de açúcar sadia carrega consigo habitualmente níveis de 10^3 a 10^4 micro-organismos por grama de planta. Mesmo com todos os cuidados básicos e corretos nas usinas, ainda terá um caldo misto de micro-organismo com contaminantes em torno de 10^6 células/mL (Amorim et al, 2009). Entretanto, um processo de fermentação considerado adequado é o que possui níveis de contaminação menores que 10^6 células/mL (Ducan et al, 1964; Hamonts et al, 2018).

Além disso, o caldo de cana pode sofrer interferência de contaminações em todas as etapas do processo (moagem, trocadores de calor, preparo e adição de insumos) até chegar ao ponto da fermentação. E, para os contaminantes, o caldo de cana de açúcar é um meio de cultura extremamente

rico, que estimula e favorece o crescimento microbiano, através de condições ideais como temperatura, pH, sais minerais, carboidratos e água (Basílio et al, 2008).

Contaminantes de origem bacteriana são bem descritos e possuem efeitos adversos na fermentação. Os gêneros mais comuns são: *Bacillus* ssp., *Achromobacter* ssp., *Micrococcus* ssp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* ssp., *Flavobacterium* ssp., *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* ssp., *Erwinia* ssp., *Xanthomonas* ssp., *Lactobacillus* ssp., *Corynebacterium* ssp., e *Leuconostoc* ssp. (Basílio, et al 2008; Egea, et al 2018).

Dentre os grupos bacterianos, as bactérias gram positivas são as mais predominantes nos isolamentos. Dentro dessa taxa, o gênero *Lactobacillus* é o mais abundante, seguido do gênero *Bacillus* (Seki, et al 1990; Dellias et al, 2018).

Contaminações fúngicas também são encontradas, e trabalhos relatam a atividade de espécies como: espécies não-*Saccharomyces*, *Candida* ssp., *Torulopsis* ssp., *Rhodotorula* ssp., *Pichia* ssp., *Komagataella* ssp., *Ascodeia* ssp., *Septoria* ssp., *Rasamsonia* ssp., *Dekkera* ssp., *Torulopsis* ssp. e *Schizosaccharomyces* ssp. como potenciais contaminantes (Cabrini, et al 1999).

Em um estudo específico para identificar a taxa de micro-organismos do fermento tratado, revelou a predominância do gênero *Saccharomyces* com cerca de 88%, seguida do gênero *Candida* ssp. com 12%, mostrando um grau significativo de contaminação por espécie não-*Saccharomyces* (Cabrini, et al 1999; Basílio, et al 2008; Szulc, et al 2017).

Independente da origem do contaminante, agindo isolado ou concomitantemente, há o risco e preocupação com problemas relacionados à produtividade, já que esses atuam diretamente na performance do processo fermentativo (Nobre, et al 2007).

Problemas de redução de produtividade estão diretamente ligados à competição de nutrientes para crescimento celular (mais específico o consumo

de açúcares), síntese e liberação de toxinas, produção de ácidos orgânicos (búterico, acético, fórmico e láctico), floculação (perda de fermento nas dornas) e ação do excesso de antibióticos no controle das contaminações, afetando a viabilidade da levedura padrão (Chang, et al 1995; Skinner, et al 2004; Zabed, et al 2014).

Produção de toxinas, ácidos e floculação, são problemas relacionados as bactérias contaminantes, principalmente as lácteas como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, que são responsáveis pelo aparecimento da floculação (Peng et al, 2001; Narvhus, et al 2003).

Os *Lactobacillus* interagem com as leveduras, onde através de ligação entre moléculas, se aderem à parede leveduriforme fazendo com que essa biomassa se condense e precipite. O *Leuconostoc* por sua vez, utiliza o açúcar do meio para formar uma espécie de goma, que ajuda na condensação das leveduras, favorecendo a floculação (Alvarez et al, 2014)

Alguns outros gêneros como *Bacillus*, *Acetobacter* juntamente com os produtores de floculação, são capazes de formar os ácidos, que diretamente afetam a viabilidade da levedura padrão (Carvalho-Neto et al, 2015; Tiukova, et al 2014)

Em relação à competitividade de nutrientes, este problema não somente pode ser causado pelas bactérias, mas também por outras leveduras que não sejam do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, visto que algumas espécies como *Candida tropicalis*, *Pichia pastoris*, *Dekkera bruxellensis*, também possuem comportamento similar à levedura padrão, como utilização e conversão de açúcares, além de possuírem alta resistência as adversidades do processo, podendo em casos extremos chegar a 30% do volume total de micro-organismos contaminantes de uma dorna de fermentação (Cabrini, et al 1999; Bassi, et al 2013; Costa, et al 2015).

A *Candida tropicalis*, foi isolada primeiramente de um paciente com bronquite fúngica no ano de 1910 e primeiramente chamada de *Oidium tropicale*. Estudos posteriores mostraram que se tratava de uma levedura, que pertencia ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, Classe *Sacchamycetales*, família

Saccharomycetaceae, gênero *Candida*, espécie *tropicalis* (Castelani et al 1912; Diezmman, et al 2004).

Sua macromorfologia compreende colônias de aspecto cremoso e aparência lisa, coloração branca a creme podendo apresentar bordas levemente enrugada. Sua microscopia possui como características a presença de blastoconídeos esféricos ou ovóides, isolados ou agrupados, podendo apresentar também pseudo-hifas ou até mesmo hifas verdadeiras como a *Candida albicans*. (Zuza-Alves et al, 2017).

Com relação às características bioquímicas, a *C. tropicalis* é capaz de fermentar alguns tipos de açúcares como: galactose, glicose, maltose, carboidratos como a trealose, e tendo como particular a assimilação de sacarose (Kutzman et al, 2011; Silva et al 2012).

É uma levedura comensal e aderente, mas também muito isolada de ambientes, com ampla distribuição em países tropicais e subtropicais (Kumar, 2018). Possui extrema relevância médica, pois é um tipo de micro-organismo que pode apresentar resistência a medicamentos como os derivados azólicos, anfotericina B e equinocandinas (Seneviratne et al., 2016).

Contudo a *C. tropicalis* tem obtido uma relevância importante por apresentar características de osmotolerância, fazendo com que essa levedura seja atualmente utilizada como potencial micro-organismo em processos biotecnológicos, como a produção de bioetanol e xilitol (Zuza-Alves et al 2016).

C. tropicalis é uma levedura diplóide e assexuada, seu genoma foi sequenciado em 2009, possui um tamanho de 14,5 Mb, com aproximadamente 12 cromossomos e contem 6.258 genes codificadores de proteínas (Doi et al., 1992).

Possui maior similaridade genética com *C. albicans* do que as outras espécies de *Candida* de interesse clínico, mas estudos mostram uma relação evolutiva com outros tipos de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparadas com características fenotípicas e bioquímicas para processos biotecnológicos (Butler et al., 2009; Wu et al., 2014).

Nas usinas brasileiras os métodos para determinação das contaminações ainda são muito restritos, visto que as metodologias mais empregadas são as de maior rapidez e baixo custo (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015). Habitualmente é utilizada a contagem microscópica dos micro-organismos, um método rápido mas muitas vezes inconclusivo, pois artefatos do meio podem ser confundidos com contaminações, e também apresenta a desvantagem de não poder oferecer informações com segurança sobre viabilidade, tanto das leveduras padrões, quanto de qualquer contaminante que possa estar interferindo no processo (Jornal da Cana, 2014)

Em associação com a microscopia as usinas utilizam a coloração de Gram, permitindo um melhor direcionamento quanto à identificação do micro-organismo, como gram positivo ou gram negativo (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015)

Além disso, em muitas usinas é utilizada a contagem de colônias em placas contendo meio sólido, que permite afirmar com segurança e porcentagem de células viáveis da levedura, bem como do contaminante (Revista RPA News Cana & Açúcar, 2015).

Esse padrão de identificação de micro-organismos nas usinas começou através da utilização de um meio seletivo, na década de 50, que tinha como objetivo a inibição do crescimento de leveduras com a utilização da actidiona (cicloheximida). Atualmente esse composto é proibido e as usinas utilizam como escolha de partida, um meio complexo onde há crescimento de múltiplas espécies (Copersucar, 1987).

Sendo assim, os meios seletivos são utilizados para direcionar sobre informações do contaminante, quanto a sua especificidade como, por exemplo, se são: bactérias totais, gram positivas, gram negativas, produtoras de goma, produtoras de ácidos, sempre buscando a peculiaridade de cada micro-organismo que deseja disseminar (Jornal da Cana. 2014).

Com as desvantagens de tempo e imprecisão de algumas metodologias mais clássicas, atualmente as usinas estão se beneficiando do uso de kits comerciais, como o Kit MC[®] (MC Desinfecção Industrial), que proporciona um

rastreamento do controle biológico por plaqueamento de diversas amostras. Além de ser um método fácil de manuseio, apresenta um resultado com maior precisão e rapidez (Jornal da Cana, 2014).

Algumas equações como Índice de Contaminação (IC), taxas de multiplicação do fermento (TMF), Recirculação Bacteriana (RC) são utilizadas pelas usinas como padrão de manutenção para contaminações (Copersucar, 1987)

Tratamentos para conter os contaminantes, são realizados através da utilização de antibióticos industriais (carbamatos, compostos quaternários, fenóis halogenados), estes são caracterizados como compostos orgânicos naturais ou sintéticos e têm o objetivo de inibir o crescimento ou causar a morte do micro-organismo contaminante. Possuem como principal característica a seletividade do alvo e desvantagem o alto custo e a promoção da resistência a alguns micro-organismos (Alcarde et al, 2003; Eughi, 2007).

Os antimicrobianos industriais utilizados na fase exponencial do crescimento dos micro-organismos na fermentação possuem diferentes tipos de ação, como bacteriostático (inibição de crescimento e sem morte celular), bactericida (presença de morte e ausência de lise celular) e bacteriolítico (presença de morte e lise celular) (Eughi, 2007).

Na indústria sucroalcooleira, os antimicrobianos efetivos possuem uma especificidade seletiva, fazendo com que estes, sejam representados por diversas substâncias, classificados quanto ao seu mecanismo de ação, como mostrado na tabela 1 (Oliveira, 1996; Denyer et al, 2002).

Tabela 1: Principais antimicrobianos, tipo e mecanismo de atuação destes compostos utilizados nas usinas sucroalcooleiras.

Antimicrobiano	Tipo	Mecanismo de Ação	Referência
Penicilina	B-lactâmico	Inibição da síntese de parede celular	Bischoff et al, 2007
Cloranfenicol	Ampla Espectro Gram + e Gram -	Inibição da síntese proteica	Pelczar et al, 1997
Monoensina sódica	Inóforo Bactericida	Utilizado como aditivo na alimentação de animais e em fermentação inibição da síntese de parede celular	Lopes et al, 2011
Tetraciclina	Ampla Espectro Gram + e Gram -	Síntese Proteica, inibindo replicação	Lui et al, 2016
Kamoram®	Bactericida	Inibição de síntese de parede, similar a moensina sódica	Revista Química Real, 2009
Oxitetraciclina	Ampla Espectro Gram+ e Gram -	Síntese Proteica, inibindo replicação	Pelczar et al, 1997
Estrptograminas (Virginamicina, Pristidamicina, Micamicina, Vernamicina)	Gram +	Síntese Proteica, inibição de cadeias peptídicas	Andreotti et al, 2004
Clindamicina	Gram +	Inibição da síntese proteica	Bischoff et al, 2007
Dióxido de Cloro (Diox®)	Desinfetante Bactericida	Inibição da síntese de parede celular	Meneguín et al, 2008
Biocidas Naturais a Base de Lúpulo	Bactérias Gram +	Transporte de metabólitos e modificação de pH intracelular	Ruckle et al, 2012

Um dos primeiros antimicrobianos foi o hexaclorofeno, presentemente sem utilidade, mas quando aplicado, apresentava boa taxa de fermentação. Atualmente se aplica uma combinação de antimicrobianos na etapa lavagem, com associação de ácido sulfúrico e posteriormente a administração antibiótico de escolha (Oliveira, 1996).

O uso excessivo desses antibióticos mostraram ao longo do tempo um quadro de resistência dos micro-organismos, além de geração de resíduos encontrados na vinhaça, sendo prejudicial e proibido para a utilização desta nos subprodutos da fermentação. Diante desses fatos, pesquisas vêm apontando para a produção de antimicrobianos naturais, conhecidos como biocidas (Ruckle et al, 2006).

A aplicação dos biocidas naturais tem um crescimento significativo na utilização de usinas e sua aplicação é empregada com sucesso contra micro-organismos contaminantes, auxiliando o controle e reduzindo principalmente a quantidade de resíduos. Outro ponto favorável quanto à escolha destes, é que em questões econômicas, os antibióticos convencionais são de alto custo, enquanto os biocidas são de custo inferior (Carrilo-Neves et al, 2017).

Em muitos países o problema de geração de resíduos é tratado como saúde pública, onde é proibida a utilização dos subprodutos da fermentação, como a levedura seca para fins de ração animal, por conta das altas dosagens de antibióticos (Christofolletti et al, 2013).

Autoridades regulatórias para detecção de resíduos de antibióticos são vigentes na maioria dos países, principalmente para utilização do sub-produto, a levedura seca. Esses órgãos de fiscalização promovem a quantificação dos resíduos, a informação para a diminuição do uso de antibióticos convencionais, o problema da resistência dos micro-organismos e a propagação para o aumento da utilização dos biocidas (Christofolletti et al, 2013).

Biocidas naturais são formulações ou produtos específicos, utilizados na desinfecção do mosto, tanque e equipamentos utilizados nas usinas sucroalcooleiras. Vários destes já são bem estabelecidos e atendem às exigências de fiscalização e das agências alimentícias em alguns países. Mas

ainda em alguns países como o Brasil, além de não apresentarem regulamentação nas agências de fiscalização também não estão nos padrões sanitários, sendo cada vez mais proibido o uso de sub-produtos da fermentação (Ji et al, 2016).

A ação dos antimicrobianos na contaminação por bactérias, principalmente as gram positivas é bem resolvida. Ainda assim, a existência da busca de um antimicrobiano ideal ainda se faz necessária (Cioch et al, 2017).

Em relação às contaminações fúngicas, pouco se conhece sobre a ação de antimicrobianos usados nesta área. A busca por um antifúngico sustentável, natural e de alta especificidade, seria essencial para as usinas, visando sua complementação contra os micro-organismos contaminantes totais do processo fermentativo (Branco et al, 2017).

Diante de novas tecnologias de estudos em níveis moleculares é interessante estudar como os micro-organismos fermentativos, *Saccharomyces cerevisiae* e contaminantes são adaptáveis a diferentes ambientes, revelando ser uma rica fonte de perfis fenotípicos na evolução das espécies (Lidzbarsky, et al., 2009; Liti, et al., 2009). Recentemente foi evidenciado que a interação do fator ambiental com micro-organismo pode influenciar na identificação de diferentes características específicas dentro de linhagens selvagens (Camarasa et al., 2011; Warringer et al., 2011). Por isso, os avanços de técnicas moleculares (*RNA-seq*, *CRYSP*, *miRNAs*, *Microarray*) buscam elucidar as características fenotípicas e genotípicas das linhagens nativas e também dos contaminantes na produção de bioetanol, demonstrando melhorias no processo fermentativo (Boria, et al., 2013; Chowdhury, et al., 2014; Liu, et al., 2016).

As últimas décadas vêm demonstrando que o dogma central da Biologia Molecular modificou, revelando que estudos antes bem validados sobre informação genética de DNA para RNA resultando na formação de proteínas, pode sofrer algumas modificações como a descoberta dos chamados RNAs não codificantes (ncRNAs) (Costa, et al., 2012).

Os ncRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que afetam a estabilidade dos RNAs mensageiros atuando na expressão de transcritos, influenciando nos controles transcricionais e pós-transcricionais (Sesma, 2016). Nos seres vivos como humanos e espécie de camundongos a maioria de seus transcritos são definidos como codificantes, onde uma parcela de 2% e 37% respectivamente são não-codificantes, em valores totais de transcritos de um genoma de cada espécie em destaque (Wery et al., 2011). Ainda há uma taxa significativa de transcritos não-codificantes em outras espécies eucarióticas como leveduras, como por exemplo, na espécie *S. cerevisiae*, na qual cerca de 15% apresentam RNAs não-codificantes (Wery et al., 2011), além de plantas onde esses ncRNAs são bem conservados (Zanca et al., 2010).

Os ncRNAs estão divididos em três famílias: os microRNAs (miRNAs), piRNAs (*PIWI-interatives RNAs*) e os siRNAs (*small-interfering RNAs*). Estas famílias apresentam origens diferentes, porém, compartilham processos específicos da via biossintética e de mecanismos de regulação (Costa et al., 2012).

Os piRNAs são ncRNAs de aproximadamente 24-31 nucleotídeos e seus mecanismos foram, primeiramente, descobertos em *Drosophila sp* (Malone et al., 2009). piRNAs são encontrados em regiões específicas do genoma e estão diretamente ligados a transposons, cuja ação é caracterizada por estar envolvida na defesa celular, dentro da regulação de linhagem germinativa e, também, de células somáticas (Khanduja et al., 2016). Estes piRNAs estão associados a um determinado grupo da família de proteínas Argonautas, as proteínas PIWI (Thomson et al., 2009).

Os siRNAs por sua vez, são ncRNAs provenientes de produtos da catálise da ação da RNA polimerase na biogênese dos ncRNAs (Watanabe et al., 2008). siRNAs são bem descritos em plantas e estudos apontam para ação em biogênese de doenças como câncer, também estudados incorporadas à nanopartículas na área de resistência à fármacos, doenças, agentes infecciosos em plantações, entre outros (Khalid et al., 2017; Sun et al., 2017).

Dentre todos os ncRNAs reconhecidos e estudados, existe uma classe com um número maior de nucleotídeos (>200), os conhecidos longos miRNAs (lncRNAs) (Wilusz et al., 2016), estes lncRNAs são encontrados em células humanas ligadas a vários processos biológicos como regulação do genoma, modificações de histonas, metilação de DNA e também ação nos processos de biogênese de doenças (Han et al., 2016). Estudos com essa classe de ncRNAs tem mostrado sua ação em organismos eucariotos como leveduras (*S. cerevisiae*) na regulação de genes em resposta a mudanças ambientais, fatores de estresse e tolerância (Yamashita et al., 2016).

A classe mais conhecida dos ncRNAs, os miRNAs, são pequenas moléculas endógenas de aproximadamente 19-21 nucleotídeos e sua descoberta ocorreu primeiramente em *Caenorhabditis elegans* (Newman et al., 2010). miRNAs são encontrados em eucariotos superiores, inferiores, procariotos, vírus e plantas, capazes de regular vários processos biológicos pós- transcricionais, incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose, entre outros (Das et al., 2016; Zhang et al., 2010; Davis-Dusenbery et al., 2010). Os genes do miRNAs estão normalmente localizados em íntrons de proteínas codificantes e regiões intragênicas subjacentes, visto que estudos recentes revelam a ação dos miRNAs em regiões de exossomas celulares (Jovicic et al., 2017).

A biogênese dos miRNAs se inicia geralmente por um gene alvo ser adenilado na região 3' e com capacete de 5-metil-guanosina na extremidade 5', em seguida, pela ação normalmente da RNA Polimerase II (Pol II). O gene é transcrito formando uma estrutura conhecida como pri-miRNA que são transcritos primários (Starega-Roslan et al., 2011). Estes transcritos primários continuam com as adaptações da fita alvo e adiciona a eles à estrutura em *loop* conhecida como *hairpin* (Zeng et al., 2005). Esta estrutura é reconhecida por um complexo que é constituído por uma enzima ribonuclease III conhecida como DROSHA e proteínas DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*), ativando uma cascata de clivagens do transcrito primário (Starega – Roslan et al., 2011). A Drosha, por sua vez, cliva esse pri-miRNA na base da junção RNA-dsRNA que é reconhecida pela DGCR8, resultando em uma

estrutura menor de 60 nucleotídeos conhecida como pre-miRNA (Han et al., 2006; Basyuk et al., 2003). O pre-miRNA e seus produtos em nível nuclear são reconhecidos pela Exportina-5 (Exp-5) na qual desempenha função de transporte do pre-miRNA do núcleo ao citoplasma (Okada et al., 2009). Em nível citoplasmático a estrutura *hairpin* desse pre-miRNA é reconhecida por um complexo chamado de RLC, onde uma enzima denominada de DICER (ribonuclease III) converte o pre-miRNA em miRNA maduro. A Dicer reconhece os produtos deixado pela Drosha no final da 3' e cliva perto do *hairpin* esse pre-miRNA em uma estrutura dupla fita de aproximadamente 22 nucleotídeos (miRNA-miRNA) (Warf et al., 2011). A Dicer não possui ação sozinha, visto que ativa uma família de proteínas chamadas de Argonautas (AGO) que ao reconhecer o ponto de função da Dicer, se liga e direciona a estrutura miRNA-miRNA a seleção de uma das fita simples (MacRae et al., 2008). A junção do RLC e Argonautas é conhecida por complexo RISC; O RISC se liga a uma das fitas do miRNA-miRNA e a outra fita é degradada, resultando numa estrutura de fita simples de miRNA (Kawamata et al., 2010), que podem então atuar por complementariedade na degradação do mRNA ou parcialmente inibindo a tradução, visto que por ação um único mRNA pode conter vários sítios de ligação de ncRNAs diferentes, bem como um único ncRNAs pode regular vários sítios de mRNAs (Place et al., 2008).

Descritos para outra classe de miRNAs, os exógenos, conhecidos como XenomiRs, são de pequenos ncRNAs, que através da dieta, afetam diretamente o perfil celular, interferindo na homeostase dos miRNAs circulantes. Os XenomiRs possuem uma característica principal que é a capacidade de transferência interespecies (Winter, 2012). Estes miRNAs exógenos são encontrados em fluidos biológicos como sangue, plasma, urina e saliva e altamente estáveis e tolerantes a condições físicoquímicas como extremidades de pH e temperatura (Perge et al., 2016). Sua transferência ocorre por meio de vesículas incluindo exossomos e microvesículas, além de proteínas de alta densidade como HDL e proteínas que possuem similaridade com as dos miRNAs celulares (Witwer et al., 2014). A ação destes XenomiRs em níveis transcricionais e pós transcricionais são semelhantes aos demais miRNAs,

atualmente utilizado com muita relevância como potencial ferramenta de prognóstico de doenças, sendo conhecidos como biomarcadores (Fabris et al., 2016).

Dentre todos os organismos que possuem produção de miRNAs, as plantas são as que apresentam maior conservação desses ncRNAs, diferenciando dos miRNAs das outras espécies na biogênese. Em plantas, a biogênese desses miRNAs possuem algumas diferenças, iniciando-se com a transcrição do gene MIR por uma Pol II dentro do pri-miRNA. Este normalmente é uma fita simples de RNA longo que é parcialmente complementada, formando o *hairpin* (Ferreira et al., 2012). No núcleo o precursor de *stem-loop* é processado por proteínas como: *Dicer-like* (DCL1), *HIPONASTIC LEAVES 1* (HYL1) e *SERRATA*, resultando em uma dupla fita de RNA, conhecida como miRNA-miRNA (Chen et al., 2005). Essa dsRNA é metilada por uma enzima *HUA ENHANCER 1* (HEN1) e ao reconhecer esta metilação a proteína HASTY transporta esse miRNA-miRNA do núcleo para o citoplasma (Poething et al., 2005; Mallory et al., 2006; Zhang et al., 2010). No citoplasma a biogênese é semelhante a dos humanos, onde uma das fitas é introduzida dentro do complexo conhecido como RISC e as proteínas AGO1 atuam ligando por complementariedade o mRNA alvo, formando miRNA maduro. O miRNA regula a expressão do mRNA alvo clivando-o e, assim, reprimindo a transcrição ou a translocação (Qi et al., 2010). Os miRNAs são bem conservados nas plantas e cerca de 3.300 destes miRNAs estão depositados em bancos de dados como o miRBase (Griffiths-Jones et al., 2011). Descobertas vêm revelando que expressão de miRNAs são encontradas sempre em certos tecidos e ou tipo celular, além de estágios específicos de desenvolvimento, como por exemplo o miR403, miR444 e o miR528 (Carrington et al., 2011).

A cana de açúcar é uma das plantas que possui o genoma mais complexo em razão de seu número variado de ploidia, com isto cerca de 34 miRNAs específicos de cana de açúcar estão depositados nos bancos de dados (Souza et al., 2008). A manipulação gênica de miRNA na cana auxilia na resistência dessa planta à adversidade como estresse hídrico, salino, entre outros (Heck et al., 2011). Zanca e colaboradores foram os pioneiros nos

estudos dos miRNAs de cana de açúcar visando a análise de expressão em distintos tecidos e órgãos dessa planta (Zanca et al., 2010), revelando a caracterização de um miRNA específico (miR528) e seu alvo (Ferreira et al., 2012; Gentile et al., 2013).

Atualmente pesquisas são publicadas de ncRNAs em fungos mostrando que leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* possuem a capacidade de produção de ncRNAs (estes ainda chamados de miRNAs-like), como também possuir áreas de transcritos não codificantes que são formados através da biogênese geral dos ncRNAs (Sesma, 2016). Wu e colaboradores, demonstram que a levedura *S. cerevisiae* possui 85% de seu genoma transcrito, na qual 15% são não codificantes, divididos entre ncRNAs e várias regiões transcritas para transcritos não codificantes como CUTs (*Cryptic Unstable Transcripts*), SUTs (*Stable Unannotated Transcripts*), XUTs (*Xrn-1-sensitive Unstable Transcripts*), MUTs (*Meiotic Unannotated Transcripts*), TERRAs (*Telomeric Repeat associated cryptic ncRNAs*) e CD-CUTs (*Cytoplasmically Degraded Cryptic Unstable Transcripts*) todos estes capazes de agir em processos biológicos a níveis transcricionais e pós-transcricionais (Wu et al., 2012).

Além disso, estudos sobre as funções dos miRNAs no desenvolvimento das alterações nos processos biológicos para distintas espécies, mas principalmente de doenças como o câncer, faz com que os miRNAs sejam ferramentas e alvos para novas abordagens terapêuticas. Estudos funcionais confirmam que os miRNAs podem agir como supressores de tumor ou oncogenes (oncomiRs), miRNAs miméticos (ação reprimida) ou moléculas direcionadas aos miRNAs induzidos (antimiRs), mostrando resultados promissores para alguns miRNAs de ação terapêutica (Rupaimoole et al, 2017).

Neste sentido, controlar as contaminações do processo de fermentação e verificar o seu comportamento na presença de variedades de culturas de micro-organismos presentes é essencial, visto que a demanda de antibióticos utilizados como padrão ouro nas usinas são sempre os mesmos e prejudiciais.

Em vista disso, nosso estudo visa elucidar o comportamento de um contaminante relevante de fermento, *Candida tropicalis*, durante um ciclo de

5. CONCLUSÕES

- Concluimos que *C. tropicalis* (C4) é um contaminante que atrapalha potencialmente o processo fermentativo e o rendimento de bioetanol, porque possui uma atividade metabólica constante até o final do processo, com viabilidade celular maior que *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2), assimila os principais açúcares utilizados como nutrientes de maneira significativa, reduzindo substratos importantes para levedura padrão, atrapalhando na produção de bioetanol.
- O estudo mostrou de maneira inédita que miRNAs de cana de açúcar são capazes de interferir no genoma de leveduras, assim comprovamos a presença de XenomiRs entre reinos diferentes;
- Dos 25 miRNAs selecionados *in silico* de cana de açúcar foram identificados 11 miRNAs significativamente expressos nas leveduras (*S. cerevisiae* e *C. tropicalis*).

- O estudo do transcriptoma de *C. tropicalis* identificou 954 genes relacionados ao processo fermentativo, sendo 444 reprimidos e 507 induzidos. Desta forma, para os genes reprimidos, foi observado aqueles relacionados ao metabolismo de aminoácidos, membrana, transporte de açúcares, piruvato descarboxilase e acetilcoA e para os induzidos, genes ligados a transcrição, splicing e spliciossoma, membrana e resistência, mostrando que a levedura contaminante compete significativamente também para o metabolismo.
- Foram identificados *in silico* em *C. tropicalis* 6 genes/alvos (CTRG_00017, CTRG_06114, CTRG_01877, CTRG_05408, CTRG_04160 e CTRG_03746) que se relacionaram com 4 miRNAs (sof-miR159e, sof-miR159a, ssp-miR1128 e sof-miR156). Duas interações específicas (interação apenas com *C. tropicalis*) foram identificadas por dois miRNAs (sof-miR 159a e sof-miR156) e que interagiram com três genes/alvos (CTRG_06114, CTRG_0416 e 03746);
- Os seis genes/alvos de *C. tropicalis* que interagiram com os quatro miRNAs identificados de cana de açúcar estavam presentes com percentual de alta identidade em diferentes gêneros de leveduras. A identificação *in silico* desses gêneros realizada pelo *blast* mostrou a interação de aproximadamente de 36 espécies de leveduras contaminantes de diferentes ecossistemas;
- Os quatro miRNAs identificados não mostraram interação *in silico* com *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ser utilizados como biomoléculas potenciais antifúngicas para o controle da contaminação de dornas de fermentação para a produção de bioetanol;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; SHIM, W.Y.; KIM, J.H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 36. n. 9. p. 1279-84, 2013.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in Alcoholic Fermentation Processes. Role of Physiological Fitness and Microbial Interactions. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.100. p. 2035- 46, 2016.
- ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Fermentation of irrigated sugarcane must. **Sci Agr.** v. 60. n. 4. p. 677- 81, 2003.
- ALEKSEEVA, O.U.; SABIRZIANOVA, T.A.; ALIAK, I.O.; KALEBINA, T.S.; KULAEV, I.S. Export of an invertase by yeast cells *Candida utilis*. **Prinke Biokhim Mikrobiol.** v. 50. n. 2. p.156- 02, 2014.
- ALVAREZ, F.; CORREA, L.F.M.; ARAÚJO, T.M.; MOTA, B.E.F.; CONCEIÇÃO, L.E.F.R.; CASTRO, I.M.; BRANDÃO, R.L. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **J Int Food Microbiol.** v. 190. p. 97-104, 2014.
- AMBAWAT, S.; SHARMA, P.; YADAV, N.R.; YADAV, R.C. MYB transcription factor Genes as Regulation for Plant Responses. an overview. **Phisiol Mol Biol Plants.** v. 19. n. 3. p. 307- 21, 2013.
- AMORIM, H.V. Fermentação Alcóolica Ciências & Tecnologia. **Fermentec.** Piracicaba, p. 448, 2005.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum. Composition and usage. In: Ingledew WM, Kelsall AGD, Kluhspies C (eds). **The alcohol textbook.** University Press, Nottingham, pp 39–46, 2009.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ethanol Production in a Petroleum Dependent World. The Brazilian Experience. **In Sugar J.** v. 67. p. 11 - 14, 2005.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 91. p. 1267 - 75, 2011.

- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific Challenges of Bioethanol Production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 91. p. 1267- 75, 2011.
- ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M.L.F. Uso de antibióticos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência. Campo Grande. **Embrapa Gado de Corte**. p. 50, 2004.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proálcool. **In Sugar J**. v. 109. p. 195200, 2007.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.R.S.; RODRIGUES, M.I. Métodos de caracterização de leveduras de processos utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**. v. 15. n. 6. p. 32-35, 1997.
- ÁRINO, J. Integrative Responses to High pH Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS**. v. 14. p. 517- 23, 2010.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology. Tool for the unification of biology. **Nature Genetics**. v. 25. n. 1. p. 25- 29, 2000.
- BARBRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R.W.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA A.J.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuelethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol Genet Genomics**. v. 28. p. 485-94, 2012.
- BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O. F.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and indentification of wild yeast contaminats of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol**. v. 56. p. 322-26, 2008.
- BASNET, H.; SU, X.B.; TAN, Y.; MUSENHELDER, J.; MERKURJIV, D.; OHGI, K.A.; HUNTER, T.; PILLUS, L.; ROSENFELD, M.G. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. **Nature**. v. 516. n. 7530. p. 267-71, 2014.

BASSI A.P.; da SILVA, J.C.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTININI, S.R. Effects of single and combined cell treatment based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentations of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 29. p. 1661- 76, 2013.

BASSO, C.P.; TENSO, A.; DARAN, J.M.; GOMBERT, A.K.; van MARIS, A.J.; PRONK, J.T.; STAMBUCK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metab Eng**. v. 13. n. 6. p. 694- 03, 2011.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**. v. 8. p. 1155- 63, 2008.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil. The industrial process and its impact on yeast fermentation. In **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2nd ed; Bernardes M.A.S.; Eds; InTech. Croatia, Rijeka, 2011; 5. 85–100.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, A.H. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In. **Congresso Nacional da STAB**, 5, Águas de São Pedro, Anais p. 45-49, 1993.

BASYUK, E.; SUAVET, F.; DOGLIO A.; BORDONNE, R.; BERTRAND, E. Human let-7 Stem-loop Precursor Harbor Features of RNase III Cleavage Products. **Nucleic Acids Res**. v. 31. p. 6593- 97, 2003.

BELTRADE, E.; VANDENBERGUE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; SIGOILLOT, J.C.; FAULDS, C. Green Energy and Technology, ed, **Springer International Publishing**. USA, New York, 2016; 175-212; ISBN. 978-3-319-30203-4

BISCHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC. K.A.; LEATHRS. T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 31. n. 11. p. 739- 44, 2007.

BODMAN, J.A.; YANG, Y.; LOGAN, M.R.; EITZEN, G. Yeast Translation Elongation Factor-1A Binds Vacuole-localized Rho1p to Facilitate Membrane Integrity Through F-actin Remodeling. **J Biol Chem**. v. 290. p. 4705- 16, 2015.

- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a Flexible Tool for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics** (Oxford, England). v. 30. p. 2114- 20, 2014.
- BORIA, I.; BOATTI, L.; PESOLE, G.; MIGNONE, F. NGS-Trex. Next Generation Sequencing Transcriptome Profile Explorer. **BMC Bioinformatics**. v. 14. p. 1 - 8, 2013.
- BRANCO, P.; FRANCISCO, D.; MONTEIRO, M.; ALMEIDA, M.G.; CALDEIRA, J.; ARNEBORG, N.; PRISTA, C.; ALBERGARIA, H. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 101. n. 1. p. 159- 71, 2017.
- BRANDÃO, L.R.; MEDEIROS, A.O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiples-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **J Water Health**. v. 8. n. 2. p. 279- 89, 2010.
- BRANDISS, M.C.; FALVERY, D.A. Proline Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Analysis of PRO3 Gene, which Encodes delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase. **J Bacteriology**. v. 174. p. 3782- 88, 1992.
- BROW, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Res**. v. 13. p. 277-90, 2013.
- BUTHER, G.; RASMUSSEN, M.D.; LIN, M.F.; SANTOS, M.A.; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C.A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**. v. 459. p. 657- 62, 2009.
- CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Sci Agr**. v. 56. n. 1. p. 1- 2, 1999.
- CAMARASA, C.; SANCHEZ, I.; BRIAL, P.; BIGELY, F.; DEQUIN, S. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* During Wine Fermentation. Evidence for Origin-dependent Metabolic Traits. **Plos One**. v. 6. p. 1- 12, 2011.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol. an

Overview About Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation. **J Biomedicine and Biotechnology**. v. 2. p. 1 - 15, 2012.

CARRILO-NEVES, D.; RUIZ, H.Á.; AGUILAR, C.N.; ILYINA, A.; PARRA-SALDIVAR, R.; TORRES, J.Á.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.L. Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. **Bioresour Technol**. v. 239. p. 430- 36, 2017.

CARRINGTON, J.C.; CUPERUS, J.T.; FAHLGREEN, N. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. **Plant Cell**. v. 23. p. 431- 42, 2011.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.J.P.L.; NORONHA, M.F.; CALDERÓN, L.A.L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J.L.; PEREIRA, G.A.G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microb Cell Fact**. v. 14. p. 1– 13, 2015.

CASTELLANI, A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **Lancet**. v. 179, p. 13- 15, 1992.

CHANG, L.S.; KIM, B.H.; SKIN, P.K.; LEE, W.K. Bacterial contaminants and its effects on ethanol fermentations. **J Microbiol Biotechnol**. v. 5. p. 309- 14, 1995.

CHATTERJEE, G.; SANKARANARAYANAN, S.R.; GUIN, K.; THATTIKOTA, Y.; PADMANABHAN, S.; SIDDHARTHAAN, K.; SANYAL, K. Repeat-associated fission yeast-like regional centromeres in the ascomycetous budding yeast *Candida tropicalis*. **Plos Genet**. v. 12. v. 2. p. 1- 28, 2016.

CHÁVEZ, F.P.; PONS, T.; DELGADO, J.M.; RODRÍGUES, L. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (INV1) from the yeast *Candida utilis*. **Yeast**. v. 14. n. 13. p. 1223- 32, 1998.

CHEN, X.; YU, B.; YANG, Z.; LI, J.; MINAKNINA, S.; YANG, M.; PADGETT, R.W.; STEWARD, R. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. **Science**. v. 307. p. 932- 35, 2005.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **J Biosci Bioeng.** v. 123. n. 3. p. 342- 6, 2017.

CHOWDHURY, A. R.; CHITTY, M.; VINM, N. X. Evaluating Influence of microRNA in Reconstructing Gene Regulatory Networks. **Cogn Neurodyn.** v. 8. p. 251- 9, 2014.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.; FONTANELLI, C.S. Sugarcane vinasse. Environmental implications of its use. **Waste Manag.** v. 33. n. 12. p. 2752- 61, 2013.

CIOCH, M.; SATORA, P.; SKOTNICZNY, M.; SEMIK-SZCZURAK, D.; TARKO, T. Characterization of antimicrobial properties of extracts of selected medical plants. **Pol J Microbiol.** v. 66. n. 4. p. 463- 72, 2017.

CONAB. Levantamento da safra 2017/18 – Março 2018. Disponível em. www.conab.gov.br. Acessado em 22 de Março, 2018, 19.25.

COPERSUCAR, Fermentação – Centro de Tecnologia Copersucar – Divisão Industrial, CTDI, 1987.

COSTA, M.C.; LEITÃO, A.L.; ENGUITA, F.J. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs. Insights from the Point of View of Structural Biology. **J Mol Sciences.** v. 13. p. 10268- 95, 2012.

COSTA, O.U., SOUTO, B.M.; TUPINAMBÁ, D.P.; BERGMANN, S.C.; KYAW, C.M.; KRUGER, R.H.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in Brazilian distillery using a culture-independent method. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 42. n. 1. p. 73- 84, 2015.

DAS, K.; GARNICA, O.; DHANDAYUTHAPANY, S. Modulation of Host miRNAs by Intracellular Bacterial Pathogens. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 6. p. 1- 14, 2016.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of Control of microRNA Biogenesis. **J Biochem.** v. 148. p. 381- 92, 2010.

De SOUZA, R.S.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.; JORÚN, B.; LOZANO, N.; da SILVA, M.J.; GONZALÉZ-GUERRERO, M.; de ARAÚJO, L.M.; VEREZA, N.C.; BAGHERI, H.C.;

- IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Sci Rep.** v. 30. n.6. p. 1-15, 2016.
- DELLIAS, M.T.F.; BORGES, C.D.; LOPES, M.L.; da CRUZ, S.H.; de AMORIM, H.V.; TSAI, S.M. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of *Lactobacillus* contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 2018. doi. 10.1007/s10482-018-1050-82018
- DENYER, S.P.; MAILLARD, J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.** v. 92, 35S–45S, 2002.
- DIEZMMAN, S.; COX, C.J.; SCHONIAN, G.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa. a multigenic analysis. **J Clin Microbiol.** v. 42. p. 5624- 35, 2004.
- DILON, S. L.; SHAPTER, F. M.; ROBERT, H. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, S.L. Domestication to Crop Improvement. Genetic Resources for Sorghum And *Saccharum* (Andropogoneae). **Ann Bot.** v. 5. p. 975 – 989, 2007.
- DOI, M.; HOMMA, M.; CHINDAMPORN, A.; TANAKA, K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PEGE) in medically important *Candida tropicalis*. **J Gen Microbiol.** v. 138. p. 2243- 51, 1992.
- DUCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Appl Microb.** v.12. n. 2. p. 173-77, 1964.
- EGEA, T.C.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; RIGONATO, J.; MONTEIRO, D.A.; GRIENING, D.; da SILVA, H.; van der WIELEN, F.; HELMES, R.; PARSONS, J.R.; GOMES, E. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Helvion.** v. 28. n. 2. p. 1- 24, 2017.
- ERYASAR, K.; KARASU-YALCIN, S. Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. 3. **Biotech.** v. 6. n. 2. p. 1- 7, 2016.
- EUGHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo. v. 2. n. 22. p. 35- 9, 2007.

FABRIS, L.; CALIN, G.A. Circulating Free xeno-microRNAs – The New Kids on the Block. **Mol Oncol**. v. 10. p. 503- 08, 2016.

FERREIRA, T.H.; GENTILE, A.; VILELA, R.D.; COSTA, G.G.L.; DIAS, L.I.; ENDRES, L.; MENOSSI, M. microRNAs Associated with Drought Response in the Bioenergy Crop Sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plos One**. v. 7. p. 1- 14, 2012.

GARCIA-VILLEGAS, R.; CAMACHO-VILLASANA, Y.; SHINGÚ-VÁZQUEZ, M.A.; CABRERA-ORIFICE, A.; URIBE-CARVAJAL, S.; FOX, T.D.; PÉREZ-MARTINEZ, X. The COX 1 C-terminal Domain is a Central Regulator of Cytochrome C Oxidase Biogenesis in Yeast Mitochondria. **J Biol Chem**. v. 292. p. 10912- 25, 2017.

GENTILE, A.; FERREIRA, T.H.; MATTOS, R.S.; DIAS, L.I.; HOSHINO, A.A.; CARNEIRO, M.S.; SOUZA, G.M.; CALSA, T.JR.; NOGUEIRA, R.M.; ENDRES, L.; MENOSSI M. Effects of Drought on the Microtranscriptome of Field-grown Sugarcane Plants. **Plant**. v.237, p.783- 98, 2013.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; MORGE, C.; SPARROW, C.; LIU, Y.; QUINTANILLA-CASAS, B.; VICHE, S.; ALEXANDRE, H. Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen Source Preferences, Impact on Sequential Fermentations and Wine Volatile Compounds Profile. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. p. 1- 13, 2017.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol Biofuels**. v. 1. p. 6- 15, 2008.

GOURNAS, C.; GKIONIS, S.; CARQUIM, M.; TWYFFELS, L.; TYTECA, D.; ANDRÉ, B. Conformation dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 3. n. 15. p. 3145- 54, 2018.

GRIFFITHS-JONES, S.; KOZOMARA, A. miRBase. Integrating microRNA Annotation and Deep-Sequencing Data. **Nucl Acids Res**. v. 39. p. 52- 7, 2011.

HAMONTS, K.; TRIVEDI, P.; GARG, A.; JANITZ, C.; GRINGER, J.; HOEFORD, P.; BOTHA, F.C.; ANDERSON, I.C.; SINGH, B.K. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environ Microbiol**. v. 20. n.1. p. 124- 40, 2018.

- HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.H.; NAM, J.W.; ZHANG, B.T.; KIM, V.N. Molecular Basics for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. **Cell**. v.125. p. 887 - 90, 2006.
- HAN, S.; LIANG, Y.; LI, Y.; DU, W. Long Noncoding RNA Identification. Comparing Machine Learning Based Tools for Long Noncoding Transcripts Discrimination. **Biomed Res Int**. v. 2016. p. 1- 14, 2016.
- HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; van MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. The Ehrlich Pathway for Fuel Alcoholic Production; a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Appl Environ Microbiol**. v. 74. p. 2259- 66, 2008.
- HECK, G.R.; VASHUTA, S.; BANKS, I.R.; WIGGS, B.E.; ZHANG, Y.; ZIEGLER, T.E.; JAMES, K. Regulation of Gene Expression in Plant Through miRNA Inactivation. **Plos One**. v. 6. p. 1 - 11, 2011.
- IIDA, H.; SAKAGUCHI, S.; YAGAWA, Y.; ANRAKU, Y. Cell Cycle control by Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol Chem J**. v. 265. n. 34. p. 21216- 22, 1990.
- JI, H.; ZHUNGE, B.; ZONG, H.; LU, X.; FANG, H.; ZHUGE, J. Role of CgHOG1 in stress response and glycerol overproduction of *Candida* glyceriogenesis. **Curr Microbiol**. v. 73. n. 6. p. 827- 33, 2016.
- JI, L.; ZHENG, T.; ZHAO, P.; ZHANG, W.; JIANG, J. Ethanol production from a biomass mixture or furfural residues with green liquor peroxide saccharified cassava liquid. **BMC Biotechnol**. v. 1. n. 16, p. 48, 2016.
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Regulation of Hydrogen Sulfite Liberation in Wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by Assimilable Nitrogen. **Appl Environ Microbiol**. v. 61. p. 461- 7, 1995.
- JOLLY, N.P.; VAREKA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your Ordinary Yeast. Non-*Saccharomyces* yeasts in Wine Production Uncovered. **FEMS Yeast Res**. v. 14. p. 215- 37, 2014.
- JORNAL DA CANA, Serie 2, n. 245, Ribeirão Preto, Julho, 2014.
- JOVICIC, A.; GLITER, A. D. Distinct Repertoires of microRNAs Present in Mouse Astrocytes Compared to Astrocyte Secreted Exosomes. **Plos One**. v. 12. p. 1 -11, 2017.

- JUNG, H.; GAYOMBA, S.R.; RUTZKE, M.A.; CRAFT, E.; KOCHIAN, L.V.; VATAMANIEEK, O.K. COPT6 is a Plasma Membrane Transporter that Functions in Copper Homeostasis in Arabidopsis and is a Novel Target of SQUAMOSA Promoter-binding Protein-like -7. **Biol Chem J**. v. 287. n. 40. p. 33252- 67, 2012.
- KAHAR, P.; RIYANTI, E.I.; OTSUKA, H.; MATSUMOTO, H.; KIHIRA, C.; OGINO, C.; KONDO, A. Challenges of Non-Flocculating *Saccharomyces cerevisiae* Haploid Strain Against Inhibitory Chemical Complex for Ethanol Production. **Biores Technol**. v. 245. p. 1436- 46, 2017.
- KATAWAKA, T.; TOMARI, Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci*. v. 35. p. 368- 76, 2010.
- KEMSAWAD, V.; VIANA, T.; ARDO, Y.; ARNEBORG, N. Influence of Nitrogen Sources on Growth and Fermentation Performance of Different Wine Yeast Species during Alcoholic Fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 99. p. 10191- 10207, 2015.
- KHALID, A.; ZHANG, Q.; YASIR, M.; LI, F. Small RNA Based Genetic Engineering for Plant Viral Resistance. Application in Crop Protection. **Front Microbiol**. v. 8. p. 1- 11, 2017.
- KHANDUJA, J. S.; CALVO, I. A.; JOH, R. I.; HILL, I. T.; MOTAMED, M. Nuclear Noncoding RNAs and Genome Stability. **Mol Cell**. v. 63. p. 7- 20, 2016.
- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S.L. HISAT. a Fast Splice Aligner with Low memory Requirements. **Nature Methods**. v.12. p. 357- 60, 2015.
- KUMAR, A. A fungus among us. The emerging opportunistic pathogen *Candida tropicalis* and PKA signaling. **Virulence**. 2018. doi. 10.1080/21505594.2018.1438026.
- KURSU, V.A.S.; PIETIKÄINEN, L.P.; FONTANESI, F.; AALTONEN, M.J.; SUOMI, F.; NAIR, R.R.; SCHONAUER, M.S.; DIECHMANN, C.L.; BARRIENTOS, A.; HILTUNEN, J.K.; KASTANIOTES, A.J. Defects in Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Result in Failure of Multiple Aspects of Mitochondrial Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**. v. 90. p. 824- 40, 2013.
- KURTZMAN, C.P. (2011) *Scheffersomyces*. KURTZMAN and M SUZUKI (2010) In. KURTZMAN CP; FELL JM; BOCKHOUT, TT (eds) The yeasts. a taxonomic study, 5Th edn. **Elsevier**, p. 773- 77, 2011.

LIDZBARRSKY, G.A.; SHKOLNIK, T.; NEVO, E. Adaptive Response to DNA-damaging Agents in Natural *Saccharomyces cerevisiae* Populations from “Evolution Canyon”, Mt. Carmel, Israel. **Plos One**. v. 4. p. 1 - 8, 2009.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M.; WARRINGER, J.; JAMES, S.A. Populations Genomics of Domestic and Wild Yeasts. **Nature**. v. 458. p. 337- 41, 2009.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M.; WARRINGER, J.; PARTS, L.; JAMES, S.A.; DAVEY, R.P.; ROBERTS, I.N.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V.; TSAI, I.J.; BERGMAN, C.M.; BENSASSON, D.; O'KELLY, M.J.; VAN OUDENAARDEN, A.; BARTON, D.B.; BAILES, E.; NGUYEN, A.N.; JONES, M.; QUAIL, M.A.; GOODHEAD, I.; SIMS, S.; SMITH, F.; BLOMBERG, A.; DURBIN, R.; LOUIS, E.J. Populations genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**. v. 458. p. 337- 4, 2009.

LIU, D.; HU, R.; PALLA, K. J.; TUSKAN, G. A.; YANG, X. Advances and Perspectives on the Use of CRISPR/Cas9 Systems in Plant Genomics Research. **Plant Biology**. v. 30. p. 70-7, 2016.

LOPES, M.B.; SILVA, T.M.B. Teste de Sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos do processo de fermentação. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v. 4. n. 3. p. 445 -65, 2011.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.B. N.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil. A bridge between science and industry. **Braz J Microbiol**. v. 47. p. 64-76, 2016.

LOVE, M.; HUBER, W.; ANDRES, S. Moderated estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. **Genome Biol**. v. 15. n. 50. p. 1- 21, 2014.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E. Green house gases emissions in the productions and use of ethanol from sugarcane in Brazil. The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**. v. 32. p. 582-95, 2008.

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**. v. 290. p. 1- 18, 2002.

- MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Functions of microRNAs and Related Small RNAs in Plants. **Nat Genetics**. v. 38. p. 531- 37, 2006.
- MALONE, C.D.; BRENNECKE, J.; DUS, M.; STARK, A.; McCOMBIE, W. R.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**. v. 137. p. 522- 35, 2009.
- MANUAL DE RECOMENDAÇÕES. Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Alcool. Instituto de Pesquisa Tecnologia. v. 1817. p. 796, 1990.
- Mc CLELLAND, L.J.; MOU, T.C.; JEAkins-COOLEY, M.E.; SPRANG, J.R.; BROWEER, B.E. Structure of a Mitochondrial Cytochrome C Conformer Competent for Peroxidase Activity. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 111. p. 6648- 53, 2014.
- Mc RAE, I.J.; MA, E.; ZHOU, M.; ROBINSON, C.V.; DOUDNA, J.A. In vitro Reconstitution of the Human RISC-loading Complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105. p. 512- 17, 2008.
- MIRANDA-SAAVEDRA, D.; BARTON, G.J. Classification and Functional Annotation of Eukaryotic Protein Kinases. **Proteins**. v. 68. n. 4. p. 893- 41, 2007.
- MIYAKAWA, T.; MIZUNUAMA, M. Physiological Roles of Calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with Special Emphasis on its roles G2/M Cell-cycle Regulation. **Biosci Biotechnol Bioch**. v. 71. n. 3. p. 633- 45, 2007.
- MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program, 1996. Disponível em. www.mct.gov.br. Acesso em 12 de Abril, 2017, 14.20.
- NARVHUS, J.Á.; GADAGA, T.H. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks. A review. **Int J Food Microbiol**. v. 86. n. 1-2, p. 51- 60, 2003.
- NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**. v. 41, n. 1, p. D8–D20, 2013.
- NEWMAN, M.A.; HAMMOND, S.M. Emerging Paradigms of Regulated microRNA Processing. **Genes Dev**. v. 24. p. 1086 - 92, 2010.
- NOBRE, T.P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Cienc. Tecnol. Aliment**. v. 27. n. 1. p. 20- 25, 2007.

OKADA, C.; YAMASHITA, E.; LEE, S.J.; SHIBATA, S.; KATAHIRA, J.; NAKAGAWA, A.; YONEDA, Y.; TSUKIHARA T. A High Resolution Structure of the pre-microRNA Nuclear Export Machinery. **Science**. v. 326. p. 1275 - 79, 2009.

OLIVEIRA, A.J. et al. Métodos para controle microbiológico na produção de açúcar e álcool. **Fermentec**. Piracicaba, p. 89, 1996.

PAES, L.A.; OLIVEIRA, M.A. Potential Trash Biomass of the Sugar Cane Plant. **PNUD and CTC**. p. 19, 2005.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRICG, N.R. **Microbiologia**. Conceitos e aplicações. 2ed. São Paulo, SP. [s.n], v. 2, 1997.

PENG, X.; SUN, J.; ISEVENTANT, D.; MICHELS, C.; VERACHTERT, H. Flocculation and coflocculation of bactéria by yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 55. n. 6. p. 51- 60, 2001.

PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnol Lett**. v. 34. p. 45- 53, 2012.

PERGE, P.; NAGY, Z.; DECMANN, A.; IGAZ, I.; IGAZ, P. Potential Relevance of microRNAs in Inter-species Epigenetic Communication, and Implications for Diseases Pathogenesis. **RNA Biol**. v. 28. p. 1- 11, 2016.

PIERRE-JEROME, E.; WRIGHT, R.C.; NEMHAUSER, J.L. Characterizing Auxin Response Circuits in *Saccharomyces cerevisiae* by Flow Cytometry. **Methods Mol Biol**. v. 1497. p. 271- 81, 2017.

PITANGUI, N.S.; SARDI, J.C.; SILVA, J.F.; BENADUCCI, T.; MORAES da SILVA, R.A.; RODRÍGUEZ-ALRELLANES, G.; TAYLOR, M.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Adeshion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**. v. 28. n. 7. p. 711- 8, 2012.

PLACE, R.F.; LI, L.C.; POOKOT, D.; NOONAN, E.J.; DAHIYA, R. MicroRNA -373 Induces Expression of Genes with Complementary Promoter Sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105. p. 1608- 13, 2008.

POETHING, R.S.; PARK, M.Y.; WU, G.; GONZALEZ-SULSER, A.; VAUCHERET, H. Nuclear Processing and Export of microRNAs in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 102. p. 11928- 33, 2005.

QI, Y.; WU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; NI, F.; LIU, C. DNA Methylation Mediated by a microRNA Pathway. **Mol Cell**. v. 38. p. 465 - 75, 2010.

QUINLAN, A.R.; NALL, I.M. BED Tool: a Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features. **Bioinformatics**. v. 26. p. 841- 42, 2010.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZNSKA, A.; MAROSZYNSKA, M. Selected essential oils as antifungal agents against antibiotic-resistant *Candida* spp in vitro study on clinical and food-borne isolates. **Microb Drug Resist**. v. 23. n. 1. p. 18-24, 2017.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F.J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**. v. 16. n. 3. p. 203-222, 2017.

REVISTA QUÍMICA REAL. Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca. Belo Horizonte. **Kamoran News**. v. 1. n. 1, mar. 2009.

REVISTA RPA NEWS CANA & INDÚSTRIA, Ano 13, n. 17, Julho 2015.

REYNA-BELTRÁN, E.; IRANZO, M.; CALDERÓN-GONZÁLEZ, K.G.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; LABRA-BARRIOS, M.L.; MORMENEO, S.; LUNA-ARIAS, J.P. The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. **J Biol Chem**. v. 293. n. 12. p. 4304- 23, 2018.

RIVERA-CALZADA, A.; PAL, M.; MUNOZ-HERNANDEZ, H.; LUQUE-ORTEGA, J.R.; GIL-CARTON, D.; DEGEISPOSTI, G.; SKEBEL, J.M.; PRODROMOU, C.; PEARL, C.; LLORCA, O. The Structure of the R2TP Complex Define a Platform for Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular Chaperone System. **Structure**. v. 25. n. 7. p. 1145- 52, 2017.

RUCKLE, L.; SENIN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products, Nuremberg**. v. 7. n. 9, 2006.

- RUTA, L.L.; KISSEN, R.; NICOLAU, I.; NEAGE, A.D.; PETRESCU, A.J.; BONES, A. M.; FARCASANU, I.C. Heavy Metal Accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* Cells Armed with Metal binding Hexapeptides Target to the Inner Face of the Plasma Membrane. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 101. n. 4. p. 5749- 63, 2017.
- SCHERES, S.H.; NAGAI, K. CryoEM Structures of Splicosomal Complexes Rural the Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing. **Curr Opin Struct Biol**. v. 46, p. 130- 9, 2017.
- SCHONAUER, M.S.; KASTANIOTES, A.J.; KURSU, V.A.S.; HILTUNEN, J.K.; DIECKMANN, C. L. Lipoic Acid Synthesis and Attachment in Yeast Mitochondria. **J Biol Chemistry**. v. 284. p. 23234- 42, 2009.
- SCHUTZ, A.; ATKIN, L.; FREY, C.N. A Fermentation Test for Vitamin B1. **J Am. Chem. Soc.** v. 59. n.11. p. 438- 49, 1937.
- SEKI, M.; KANEUCHI, C.; KUMNNATA, J.; MANTIRUNGIJ, M.; OHOMONO, T.; KOMAGATA, K. Identification of lactic acid bacteria isolated from fermented cane molasses at acohol plants in Thailand. Bulletin J. Federation for Culture Colletion. v. 5. n. 2. p. 80- 8, 1989, **Apud Sugar Industry Abstracts**. v. 52. n. 4. p. 115, 1990.
- SENEVIRATNE, C.J.; RAJAN, S.; WONG, S.S.; TSANG, D.N.; LAI, C.K.; SAMARANAYAKE, L.P. Antifungal susceptibility in sérum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. **Front Microbiol**. v. 7. p. 1- 8, 2016.
- SESMA, A. RNA Metabolism and Regulation of Virulence Programs in Fungi. **Semin Cell Dev Biol**. v. 57. p. 120- 7, 2016.
- SHI, Y. The Spliceosome. A Protein-directed Metalloribozyme. **J Mol Biol**. v. 429. p. 2640- 53, 2017.
- SILVA, S.; NEGRINI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**. v. 36. p. 288- 05, 2012.
- SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 31. n. 9. p. 401- 8, 2004.

SOUZA, G.M.; MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VICENTZ, M.; Van-SLUYS, M. Sugarcane Functional Genomics. Gene Discovery for Agronomic Trait Development. **In J Plan Gen.** v. 2008. p. 1- 11, 2008.

STAREGA-ROSLAN, J.; KOSCIANKA, E.; KOZLOWSKI, P.; KRZYZOSIAK, W.J. The Role of the Precursor Structure in the Biogenesis of microRNA. **Cell Mol Life Sci.** v. 68. p. 2859-71, 2011.

SUN, H.; YAROVY, I.; CAPELING, M.; CHENG, C. Polymers in the Co-delivery of siRNA and Anticancer Drugs for the Treatment of Cancers. **J Top Curr Chem.** v. 375. p. 1- 30, 2017.

SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **Plos One**, v. 6. n. 7. p. e21800, 2011.

SUZUKI, T.; IMANISHE, Y.; IWAGUCHI, S.; KAMIHARA, T. Despolarized Cell Growth Proceeds Filamentation During the Process of Ethanol-induced Pseudohyphal Formation in the Yeast *Candida tropicalis*. **Microbiology.** v. 144. p. 403- 10, 1998.

SZULC, J.; OTLEWSKA, A.; OKRASA, M.; MAJCHRZYCKA, K.; SULEYOK, M.; GUTAROWSKA, B. Microbiological Contamination at Workplaces in a Combined Heat and Power (CHP) Station Processing Plant Biomass. **Int J Environ Res Public Health.** v. 14. n.1. p. 1, 2017.

TAKAGY, H. Proline as a Stress Protectant in Yeast. Physiological Functions Metabolic Regulations, and Biotechnological Applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 81. p. 21-3, 2008.

THOMSON, T.; LIN, H. The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs. Progress and Prospect. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 25. p. 355- 76, 2009.

TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of Lactobacillus in with the ethanol production yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Appl Biochem.** v. 61. n.1. p. 40- 4, 2014.

TRAVELYN, W.; HARRISON, J.S. Studies on Yeast Metabolism. IV. The Effect the Thiamine on Yeast Fermentation. **Biochem J.** v. 57. n. 4. p. 561- 6, 1954.

- WANG, H.; LIANG, Y.; ZHANG, B.; ZHENG, W.; XING, L.; LI, M. Alkaline Stress Triggers an Immediate Calcium Fluctuation in *Candida albicans* mediated by RIM 101p and Crz1p Transcription Factor. **FEMS Yeast Res.** v. 11. p. 430- 39, 2011.
- WANG, X.; CARLSSON, A.E. A Master equation Approach to Actin Polymerization Applied to Endocytosis in Yeast. **Plos One.** v. 14. p. 1- 22, 2017.
- WARD, O. Biotecnología de la Fermentatación. Zaragoza. **Acribia.** p. 155, 1991.
- WARF, M.B.; JOHNSON, W.E.; BASS, B.L. Improved Annotation of *C. elegans* microRNAs by Deep Sequencing Reveals Structures Associated with Processing by Drosha and Dicer. **RNA.** v. 17. p.563- 77, 2011.
- WARRINGER, J.; CUBILLOS, F.A.; ZIA, A.; GJUVSLAND, A.; SIMPSON, J.D. Trait Variation in Yeast is Defined by Population History. **Plos Genet.** v. 6. p. 1 -15, 2011.
- WASMUTH, E. V.; LIMA, C. D. UniProt. the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research.** v. 45. p. 1–12, 2016.
- WATANABE, T.; TOTOKI, Y.; TOYODA, A.; KANEDA, M.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; OBATA, Y.; CHIBA, H.; KOHARA, Y.; KONO, T.; NOKANO, T. Endogenous siRNAs from Naturally Formed dsRNA Regulate Transcripts in Mouse Oocytes. **Nature.** v. 453. p. 539- 43, 2008.
- WERY, M.; KWAPISZ, M.; MORILLON, A. Noncoding RNAs in Gene Regulation. **Wires Syst Biol Med.** v. 3. p. 728– 38, 2011.
- WILUSZ, J. E. Long Noncoding RNAs. Re-writing Dogmas of RNA Processing and Stability. **Biochim Biophys Acta.** v. 1859. p. 128– 38, 2016.
- WINTER, K. M. XenomiRs and miRNA Homeostasis in Health and Disease Evidence that Diet and Dietary miRNA Directly and Indirectly Influence Circulating. **RNA Biol.** v. 9. p. 1147- 54, 2012.
- WITWER, K. W.; HIRSCHI, K. D. Transfer and Functional Consequences of Dietary microRNAs in Vertebrates. Concepts in Search of Corroboration. **Bioessays.** v. 36. p. 394- 06, 2014.
- WU, J.; DELNERI, D.; O'KEEFE, T. Non – coding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. What is the function? **Biochem Soc Trans.** v. 40. p. 907- 11, 2012.

- WU, Y.; ZHOU, H.J.; CHE, J.; LI, W.G.; BEAN, F.N.; YU, S.B. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. **BMC Microbiol.** v. 14. p. 1- 12, 2014.
- YAMASHITA, A.; SCHICHINO, Y.; YAMAMOTO, M. The Long non-coding RNA World in Yeast. **Biochim Biophys Acta.** v. 1859. p. 147- 54, 2016.
- ZABED, H.; FARUG, G.; SAHU, J.N.; AZIRUN, M.S.; HASHEN, R.; BOYCE, A.M. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **Scientific World Journal.** v. 12, p. 1- 11, 2014.
- ZANCA A.S.; VICENTINI R.; ORTIZ-MOREA F.A.; DEL BEM L.E.V.; SILVA M.J.; VICENTZ M.; NOGUEIRA F.T.S. Identification and Expression Analysis of microRNAs and Targets in the Biofuel Crop Sugarcane. **BMC Plant Biol.** v.10, p.1- 13, 2010.
- ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.; GIORDANO, R.C.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 86. p. 1147 - 61, 2000.
- ZENG, Y.; CULLEN, B.R. Efficient Processing of Primary microRNA Hairpins by Drosha Requires Flanking Nonstructured RNA Sequences. **J Biol Chem.** v. 280. p. 27595- 03, 2005.
- ZHANG, L.; ZHANG, L.; DING, Z.; WANG, Z.; SHI, G. Metabolic engineering for improving ethanol fermentation of xylose by wild yeast. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.** v. 24. n. 6. p. 950- 6, 2008.
- ZHANG, Z.; YU, J.; ZHANG, D. L. Z.; LIU, F.; ZHOU, X.; WANG, T.; LING, Y.; SU, Z. PMRD. Plant microRNA Database. **Nucleic Acids Res.** v. 38. p. 806 - 13, 2010.
- ZHAO, H.; WANG, Q.; LUI, C.; SHANG, Y.; WEN, F.; WANG, F.; LUI, W.; XIAO, W.; LI, W. A Role for Respiration in Regulating Meiosis Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.** v. 4. p. 1- 28, 2018.
- ZUZA-ALVES, D.L.; de MEDEIROS, S.S.; de SOUZA, L.B.; SILVA-ROCHA, W.P.; FRANCISCO, E.C.; de ARAÚJO, M.C. Evalution of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifunfal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal enviroment of Northeast Brazil. **Front Microbiol.** v. 7. p. 1- 13, 2016.

ZUZA-ALVES, D.L; SILVA-ROCHA, W.P.; CHAVES, G.M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Front Microbiol.** v. 3. n. 8. p. 1927, 2017.