

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM ENERGIA DA BIOMASSA**

Alex Alves Dantas

**Bioprospecção de bactérias lignocelulolíticas a partir do intestino de larvas da**  
***Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae).**

Rio Largo - AL  
2017

Alex Alves Dantas

**Bioprospecção de bactérias lignocelulolíticas a partir do intestino de larvas da *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Energia da Biomassa, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Professora Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida.

Rio Largo - AL  
2017

Catalogação na fonte  
Universidade Federal de Alagoas  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

D192b Dantas, Alex Alves

Bioprospecção de bactérias lignocelulolíticas a partir do intestino de larvas da *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae) – 2017.

58 f.; il; 33 cm

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida  
Dissertação (Mestrado em Energia da Biomassa) -  
Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio  
Largo, 2017.

Inclui bibliografia

1. Bactérias 2. Enzimas 3. Etanol 2G I. Título.

CDU: 620.91

## TERMO DE APROVAÇÃO

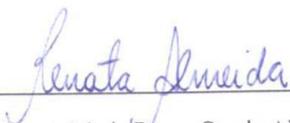
ALEX ALVES DANTAS

### BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS A PARTIR DO INTESTINO DE LAVRAS DA HELICOVERPA ARMIGERA (HUBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre Profissional em Energia da Biomassa, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 15/02/2017



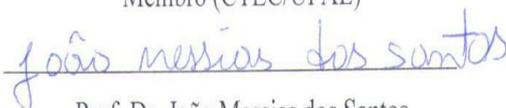
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Orientadora (PPGEB/UFAL)



Dr.<sup>a</sup>. Livia Maria de Oliveira Ribeiro

Membro (CTEC/UFAL)



Prof. Dr. João Messias dos Santos

Membro (PPGEB/UFAL)



Prof. Dr. Cicero Luiz Calazans de Lima

Membro (PPGEB/UFAL)

Rio Largo – AL

2017

## **Dedicatória**

A minha família e amigos, que incondicionalmente me apoiaram, em todos os momentos, aguentando meus abusos e chatices.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nosso Senhor Jesus Cristo que sempre estiveram dando forças e presente a meu lado me concedendo toda sabedoria e conhecimento para realização deste trabalho.

Aos meus pais que não mediram esforços durante toda minha vida para apoiar e conceder todos os ensinamentos e educação que me foram proporcionados, sendo minhas asas a todos os momentos, meu céu, meu chão.

Ao estimado prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, meus maiores e sinceros agradecimentos, pela sua orientação durante o tempo que me foi concedida, pelas ótimas condições de trabalho disponível em seu laboratório, pela grande disponibilidade, pela paciência que sempre teve e por seus importantes ensinamentos.

À minha orientadora, Dr. Renata Maria Rosas Garcia Almeida, que literalmente me adotou, abriu as portas de seu laboratório e me concedeu todos os seus ensinamentos e utensílios do laboratório. Pela sua orientação e conselhos.

Ao MSc. Kledson Lopes Barbosa, que sem sombras de dúvidas me auxiliou, acompanhou e me propiciou a realização deste trabalho com seu imenso conhecimento e profissionalismo, estando presente em todos os momentos. Por dividir comigo seus ensinamentos e amizade, sua ajuda foi primordial para a realização deste trabalho.

Aos alunos dos Laboratórios de Tecnologia de Bebidas e Alimentos e o de microscopia e genética de microrganismos, pela colaboração e contribuição na realização de todos os experimentos, por eles me auxiliarem em todos os momentos que precisei.

Aos colegas de curso, Antônio, Jumelice e Adriana (Ivo nem tanto) pela paciência, cordialidade, amizade e pelos ensinamentos. Por eles estarem me acompanhado e partilhando todos os seus ensinamentos. Pelos conselhos e momentos partilhados de estudos que contribuíram consideravelmente pra realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Geraldo Verissimo de S. Barbosa e Dr. João Messias dos Santos pelo enorme aprendizado, cordialidade e paciência durante todo o curso.

Aos demais colegas de curso e a todos os professores e funcionários da Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Energia da Biomassa, pela imensa contribuição e a todo o desenvolvimento pessoal e profissional proporcionados. Principalmente aos professores que tiveram paciência e confiança em partilhar seus ensinamentos e conselhos.

Aos colegas de graduação, Fabiana, Ricardo e Thaíse (e muitos outros) que me apoiaram e me incentivaram para buscar uma qualificação e conseqüentemente realização

pessoal, assim como seus conselhos, companheirismo e infinita amizade ao qual me proporcionam.

À Universidade Federal de Alagoas, pela estrutura e materiais que me foram cedidos, bem como a oportunidade de realização da pós-graduação, no mesmo ambiente ao qual sou funcionário de trabalho.

Aos colegas de trabalhos da Universidade Federal de Alagoas e Escola Estadual Floriano Peixoto, pela confiança e companheirismo, e a meus gestores por proporcionarem a condição de estudar ao mesmo tempo de lidar com as atividades de trabalho.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram ou torceram para que a realização deste trabalho fosse possível.

## RESUMO

Os materiais lignocelulósicos possuem como principais componentes lignina, hemicelulose e celulose. Presentes nas inúmeras fontes de biomassa e devido à sua abundância e fins diversos os tornam materiais com alto valor agregado principalmente por viabilizarem junto a microrganismos que produzem enzimas celulolíticas o processo biológico de produção de etanol 2G entre outros produtos. No presente trabalho foram utilizados microrganismos presentes no intestino de larvas de *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) degradadoras de Palma Forrageira (*Nopalea cochenillifera*) como fonte de biomassa, objetivando isolar e identificar microrganismos que sejam utilizados na produção de etanol 2G. Por meio da interação existente do corante vermelho Congo com os polissacarídeos que possuem ligações  $\beta$ -1,4 – D-glucopiranosil determina-se de forma rápida e qualitativa os respectivos produtores de celulases, esta interação com o corante produz um halo que indica a hidrólise e fornece os índices enzimáticos que possibilitaram determinar a atividade catalítica das celulases e a atividade de CMCase extracelular. A partir das larvas coletadas (N = 15) apenas nove (09) delas se alimentaram da palma forrageira e destas apenas três (03) apresentaram crescimento bacteriano. Foram obtidos dois (02) isolados bacterianos onde apenas um (01) apresentou degradação do material lignocelulósico como fonte de carbono. O presente estudo utilizou como substrato na determinação da atividade catalítica das celulases bagaço de cana-de-açúcar, farelo de palma forrageira e farelo de soja, apresentando 4,79, 6,72 e 8,69 como índice enzimático respectivamente. Na atividade de CMCase extracelular foi utilizado CMC como suplemento, apresentando 4,58 de índice enzimático. Foram utilizados diferentes substratos na determinação da atividade enzimática endocelulolítica, utilizando CMC ( $4,38 \text{ UI.mL}^{-1}$ ), celulose ( $1,69 \text{ UI.mL}^{-1}$ ) e Bagaço de cana-de-açúcar ( $4,17 \text{ UI.mL}^{-1}$ ). A densidade óptica permitiu traçar uma curva de crescimento do isolado bacteriano numa cultura líquida, que ao longo de 32 horas de incubação apresentou pico máximo de crescimento às 23 horas. O processo de extração e de purificação do DNA obteve material com uma banda de referência a 450 Bp do material.

**Palavras-chave:** Bioprospecção. Bactérias. Enzimas. Etanol 2G.

## ABSTRACT

Lignocellulosic materials have as main components lignin, hemicellulose and cellulose. it present in the innumerable sources of biomass and due to their abundance and diverse purposes make it materials with high added value mainly by to make viable together the microorganisms that produce cellulolytic enzymes the biological process of production of 2G ethanol among other products. In the present work, microorganisms present in the intestine of *Helicoverpa armigera* larvae (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) degrade Forage Palm (*Nopalea cochenillifera*) were used as a source of biomass objectifying to isolate and identification of microorganisms used in the production of 2G ethanol. By means of the existing interaction of Congo red dye with polysaccharides that have  $\beta$ -1,4-D-glucopyranosyl their respective cellulase producers are rapidly and qualitatively determined, this interaction with the dye produces a halo indicating a hydrolysis And to provide the enzymatic index that allowed to determine a catalytic activity of cellulases and the activity of extracellular CMCase. From the collected larvae (N = 15), only nine (09) of them were fed on the forage palm and only three (03) of them presented bacterial growth. Two (02) bacterial isolates were obtained where only one (01) showed degradation of the lignocellulosic material as carbon source. The present study used as substrate in the determination of the catalytic activity of cellulases sugarcane bagasse, forage palm meal and soybean meal, presenting 4,79, 6,72 and 8,69 as enzymatic index, respectively. In the extracellular CMCase activity CMC was used as supplement, presenting 4.58 enzymatic index. Different substrates were used in the determination of endocellulolytic enzymatic activity, using CMC ( $4.38 \text{ UI.mL}^{-1}$ ), cellulose ( $\text{UI.mL}^{-1}$ ) and sugarcane bagasse ( $4.17 \text{ UI.mL}^{-1}$ ). Optical density allowed to plot a maximum growth curve of the bacterial isolate in a liquid culture, which over 32 hours of incubation showed peak growth at 23 hours. The extraction and purification process of the DNA obtained material with a reference band at 450 Bp of the material.

**Key-words:** Bioprospecting. Bacteria. Enzymes. Ethanol 2G.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte de uma estrutura vegetal celular, demonstrando a presença de lignina, hemicelulose e celulose.....	15
Figura 2: Representação da cadeia de celulose com a ligação $\beta$ -(1,4)-glicosídica, e celobiose .....	15
Figura 3: Estrutura das regiões amorfas (microfibrilas) e cristalinas (fibrilas) da celulose .....	16
Figura 4: Unidades monossacarídicas da hemicelulose.....	17
Figura 5: Estrutura da Lignina.....	18
Figura 6: Estratégias para a produção de biocombustíveis de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica.....	19
Figura 7: Representação esquemática do processo multi-enzimático envolvido na hidrólise da celulose.....	22
Figura 8: Vista lateral da <i>Helicoverpa Armigera</i> .....	23
Figura 9: Passos na replicação da molécula de DNA .....	26
Figura 10: Isolados obtidos do microrganismo (cultivados em meio salina mínimo (placa a) e repicados em meio agar orientation (placa b)).....	35
Figura 11: Ensaio de atividade celulolítica qualitativa do isolado bacteriano.....	36
Figura 12: Imagens do halo da colônia e halo da hidrólise, suplementados com bagaço de cana-de-açúcar (fig. a), farelo de palma forrageira (fig. b) e farelo de soja (fig. c).....	37
Figura 13: Produto de PCR (dna bacteriano) em gel de agarose 0,8 %; onde P é o DNA da amostra, M é o marcador (kbr) de peso molecular 1500 pb, produto da reação de PCR com os oligonucleotídeos da região do gene 16s rDNA .....	39
Figura 14: Halo de crescimento de atividade cmcase extracelular. ....	40
Figura 15: Atividade enzimática endocelulolítica utilizando CMC como substrato. ....	42
Figura 16: Atividade enzimática endocelulolítica utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato .....	42
Figura 17: Atividade enzimática endocelulolítica utilizando celulose como substrato .....	43
Figura 18: Estudo comparativo da atividade enzimática endocelulolítica utilizando diferentes substratos.....	44
Figura 19: Estudo da cinética de crescimento bacteriano do isolado em estudo .....	45
Figura 20: Curva padrão de glicose proposta por Miller, 1959. Utilizada para quantificar atividade enzimática .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de materiais lignocelulósicos e proteínas presentes em duas espécies de palma forrageira .....	28
Tabela 2: Composição do meio de triagem em placas de petri. ....	31
Tabela 3: Índice de atividade enzimática (ie) calculada após 14 dias de cultivo dos isolados com suplementos diferentes. ....	38
Tabela 4: Correspondem às medias das medidas dos halos nos experimentos realizados em diferentes placas de petri, todavia, nas mesmas condições .....	41

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1	Combustível fóssil	14
2.2	Constituição dos materiais Lignocelulósicos	14
2.2.1	Celulose	15
2.2.2	Hemicelulose	16
2.2.3	Lignina	17
2.3	Produção de Etanol 2G	18
2.4	Enzimas	20
2.5	<i>Helicoverpa armigera</i>	22
2.6	Bioprospecção de Microrganismos	23
2.7	Técnicas moleculares	24
2.8	Fontes de biomassa	27
3	<b>JUSTIFICATIVA</b>	29
4	<b>OBJETIVOS</b>	30
4.1	Objetivo Geral	30
4.2	Objetivos Específicos	30
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
5.1	Local do experimento e descrição do sistema	31
5.2	Procedimentos adotados para as análises	31
5.2.1	Isolamento de bactérias celulolíticas	31
5.2.2	Extração e Quantificação do DNA em gel de Agarose	32
5.2.3	Método de coloração com Vermelho Congo	32
5.2.4	Determinação da atividade catalítica das celulasas	33
5.2.5	Atividade de CMCcase extracelular	33
5.2.6	Teste de atividade enzimática endocelulolítica	33
5.2.7	Curva de Crescimento Bacteriano	34
5.2.8	Análise de Dados	34
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	35
6.1	Isolamento de bactérias celulolíticas	35
6.2	Ensaio de Atividade Extracelular	36
6.3	Determinação da atividade catalítica das celulasas	37
6.4	Extração e Quantificação do DNA Bacteriano	39
6.5	Atividade de CMCcase extracelular	40
6.6	Testes de atividade enzimática endocelulolítica	41
6.6.1	Atividade enzimática utilizando diferentes substratos	41
6.7	Curva de Crescimento Bacteriano	44
7	<b>CONCLUSÕES</b>	47
8	<b>PERSPECTIVAS</b>	48
	<b>REFERÊNCIAS</b>	49
	<b>APÊNDICE</b>	58

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses sistemas possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e que podem ser encontrados em abundância no Brasil (CARVALHO, 2013).

Tanto bactérias como fungos são amplamente utilizados por conta de suas capacidades em produzir diferentes tipos de enzimas, dentre elas, destaca-se as celulasas devido seu potencial em degradar diferentes materiais lignocelulósicos libertando açúcares fermentescíveis, que servem de substratos para produção de biocombustíveis e outros bioprodutos, o que têm atraído bastante atenção devido as suas diversas aplicações na indústria e na ciência (SUKUMARAM et al., 2005).

Desta forma, estudar a produção de enzimas celulasas, tendo como objetivo uma diminuição nos elevados custos de processo de produção e visando sua distribuição e comercialização, é de extrema importância, principalmente para o mercado mundial, o qual utiliza as enzimas nas indústrias de alimentos, bebidas, ração animal, têxtil, papel e combustíveis (BAI et al., 2013).

As celulasas possuem uma vasta aplicação, e são principalmente utilizadas para degradar a celulose presente na biomassa vegetal. As enzimas celulolíticas são produzidas por uma infinidade de microrganismos, sendo importantes neste processo de bioconversão (MUSSATO, 2007).

Os microrganismos possuem uma elevada capacidade de realizar diversas transformações químicas, dentre elas, a produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica que ocorre através da hidrólise enzimática para a quebra de moléculas de celulose e produção de açúcares fermentescíveis (SILVA, 2010; WACKETT, 2013).

A hidrólise enzimática é específica ao substrato não havendo reações e produtos secundários e as reações não necessitam de condições extremas. Apesar disso o tipo de processo de hidrólise a ser empregado irá depender do tipo de material lignocelulósico a que deverá ser utilizado (SOCCOL et al. 2010).

A bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas encontrados no intestino de muitos insetos herbívoros que ocorrem naturalmente no meio ambiente,

constitui uma ferramenta promissora para minimizar a dependência do consumo das enzimas internacionais, as quais encarecem o processo de produção de biocombustíveis (SUN e SCHARF, 2010).

Demonstrando assim a extrema importância de realizar a bioprospecção de bactérias lignocelulolíticas, e avaliar seu potencial para as indústrias emergentes de biocombustíveis, o presente estudo busca avaliar a produção de enzimas celulolíticas a partir de bactérias simbióticas presentes no intestino de larvas de *Helicoverpa armigera*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Combustível fóssil

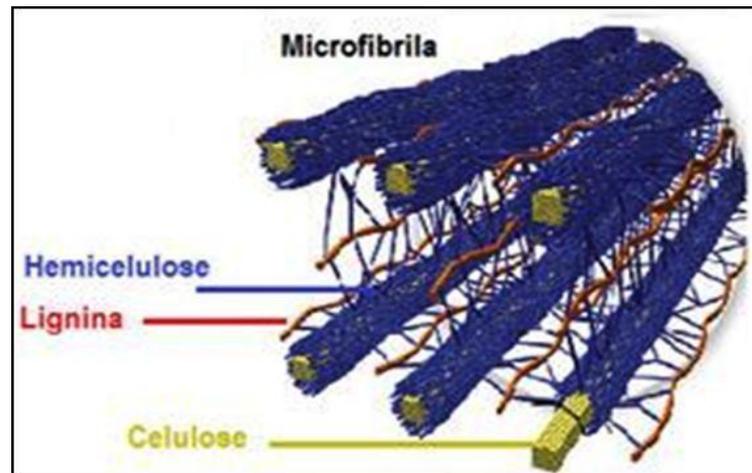
A crise por fontes energéticas tem incentivado a busca por combustíveis limpos e renováveis. Diversos países são produtores dos biocombustíveis obtidos das mais variadas fontes de biomassas como alternativa para as barreiras impostas pelos combustíveis derivados do petróleo, uma vez que são responsáveis por boa parte do consumo de energia primária no mundo. Todavia, essa preocupação não está relacionada apenas com a iminente escassez, mas também com o aumento do clima, devido aos gases tóxicos e a poluição gerada e liberada na atmosfera pela combustão incompleta dos combustíveis fósseis (CHENG e WANG, 2013).

O etanol de segunda geração é produzido através da biomassa lignocelulósica. Materiais como os resíduos agrícolas (bagaço e palha de cana-de-açúcar), industriais e florestais, que em sua maioria são queimados e/ou descartados, podem ser utilizados como matérias-primas para obtenção de etanol (BASTOS, 2007).

### 2.2 Constituição dos materiais Lignocelulósicos

O polissacarídeo celulose se encontra protegido por uma camada de hemicelulose, sendo esta um elemento que fornece a chave estrutural da parede celular presente nas plantas, trata-se de polímeros altamente ramificados constituídos de glicose e xilose respectivamente. Ademais, um dos maiores problemas na extração da celulose contida na biomassa vegetal é a lignina (Figura 1), devido sua rigidez e diversos inibidores presentes em sua constituição.

Figura 1 - Corte de uma estrutura vegetal celular, demonstrando a presença de lignina, hemicelulose e celulose.



Fonte: CTC, 2014.

### 2.2.1 Celulose

Tanto a celulose que é o principal constituinte da parede celular vegetal, como a hemicelulose que é composta por polissacarídeos ramificados, são fontes de açúcares fermentescíveis. Sendo assim, estes açúcares são produzidos após um processo prévio de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos, e posteriormente seguido pela hidrólise enzimática (WANG et al.,2009).

A celulose é o constituinte principal da biomassa lignocelulósica. Sendo um polissacarídeo, na forma de um polímero de D-glicopirranose (glicose) com cadeias que apresentam ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , conforme Figura 2, onde sua unidade monomérica é a celobiose.

Figura 2 - Representação da cadeia de celulose com a Ligação  $\beta$ -(1,4)-glicosídica, e celobiose.



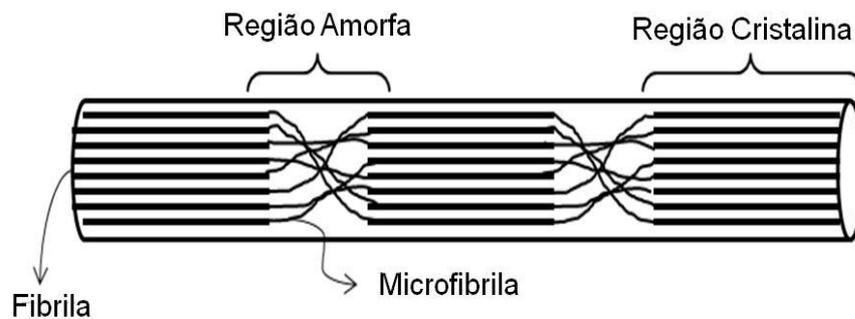
Fonte: FARINAS, 2011.

As cadeias de celulose estão alinhadas formando fibrilas elementares, que por sua vez, realizam várias ligações de hidrogênio. Sendo que, várias unidades dessas fibrilas originam as microfibrilas que são rígidas e insolúveis. Estas apresentam regiões denominadas cristalinas

por serem mais ordenadas e pelo elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias ligadas em paralelo. Existem ainda regiões menos ordenadas, denominadas regiões amorfas, conforme Figura 3. E são características presentes na estrutura da celulose que proporcionam a sua estrutura resistência ao ataque enzimático ou por hidrólise, isso se deve principalmente pelas ligações de hidrogênio (BON, GIRIO, PEREIRA JUNIOR, 2008; BISPO, 2010).

Para que ocorra clivagem da celulose é necessário que as enzimas consigam adentrar entre as cadeias próximas a fibra. A partir do momento que as fibras perdem seu aspecto cristalino, apresentando regiões amorfas, os microrganismos celulolíticos liberam as enzimas celulolíticas para realizar a hidrólise, agindo em regiões onde a estrutura do substrato seja mais acessível (BAYER e LAMED 1992; BÉGUIN e AUBERT 1994).

Figura 3 - Estrutura das regiões amorfas (microfibrilas) e cristalinas (fibrilas) da celulose



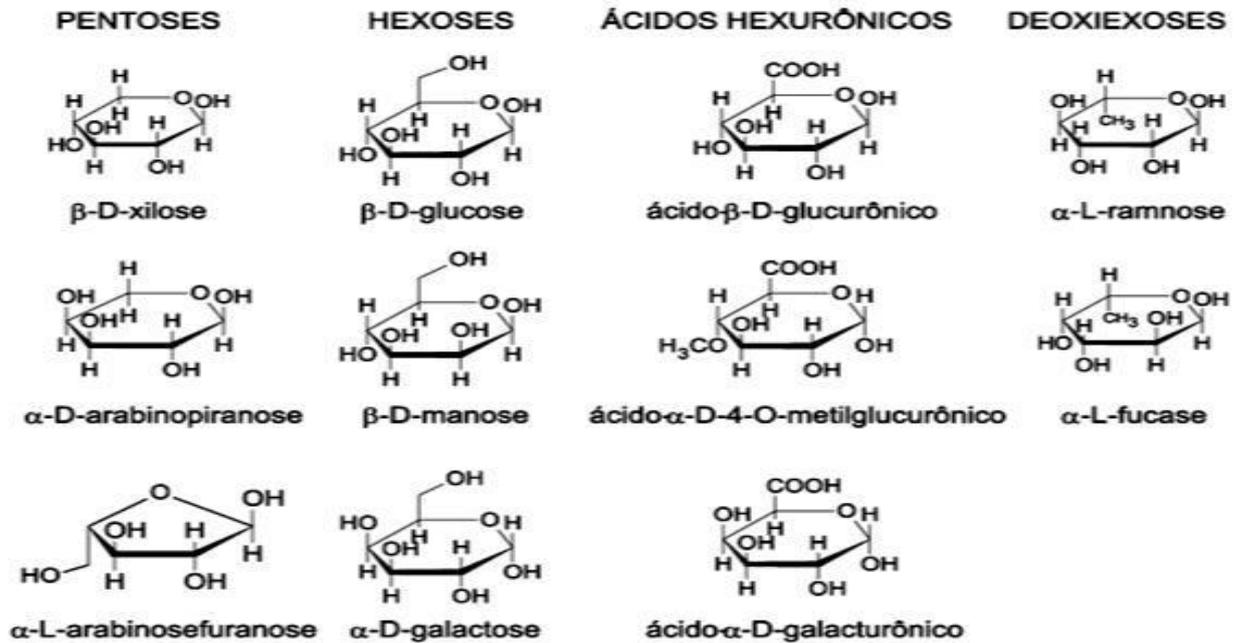
Fonte: LYND, 2002.

### 2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é caracterizada por uma mistura complexa de carboidratos (ácidos urônicos e açúcares) poliméricos, dentre eles a xilana, xiloglicana, arabinose, manose, glicose e galactose (Figura 4). Ela apresenta Carboidratos que possuem 5 e 6 átomos de carbonos, contendo inclusive ácidos hexurônicos. Tendo como principal componente a xilana (SHALLOM et al., 2003; DWIVEDI et al., 2009).

Quanto maior for a diversidade de seus constituintes, mais complexo se torna a estrutura da hemicelulose, porém é bem mais hidrolisável que a celulose. Pelo fato de possuir uma estrutura complexa, a sua degradação demanda de um serie de enzimas, sendo a endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase e a endo-1,4- $\beta$ -D-mananase, suas principais, capazes de realizar a degradação da hemicelulose (SINGH et al., 2003; KOROIVA, 2011).

Figura 4 - Unidades monossacarídicas da hemicelulose.



Fonte: MORAIS, 2005.

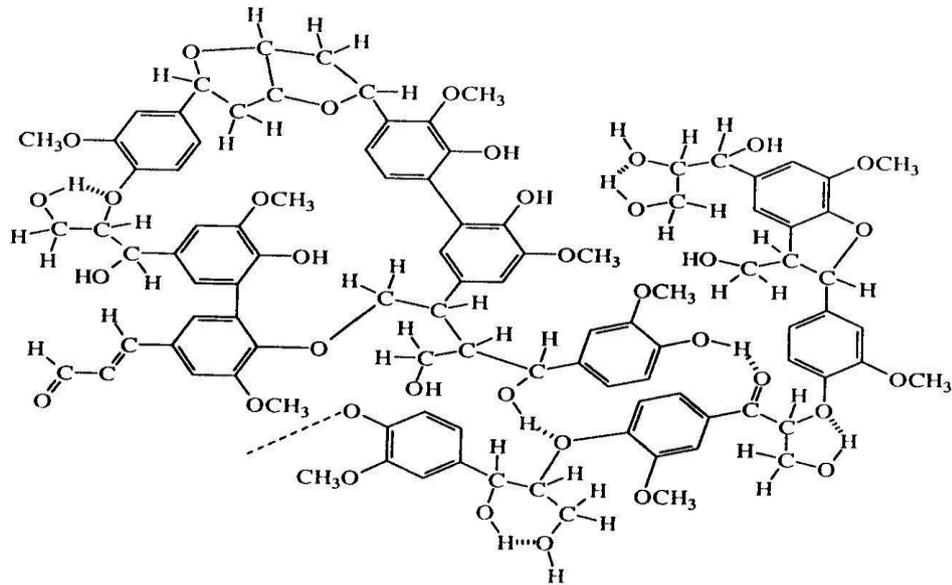
### 2.2.3 Lignina

A lignina não possui estrutura cristalina, por isso é considerado um polímero amorfo, sendo uma macromolécula rica em compostos aromáticos, apresentando resíduos fenólicos (Figura 5). Ela encontra-se em conjunto com celulose e hemicelulose, dificultando a degradação desses materiais, fornecendo rigidez ao conjunto de fibras presentes na celulose, sendo considerado um dos materiais mais resistentes da natureza, apresentando várias ligações do tipo carbono-carbono e aril-éter fornecendo à estrutura bastante resistência aos ataques químicos e enzimáticos (ESPOSITO e ANTONIETTI, 2015).

A lignina não é fonte de açúcares fermentescíveis, contudo é importante considerar sua presença no processo por fornecer inibidores microbianos prejudicando o processo de fermentação (VAN MARIS et al., 2006; FILHO, 2014).

Além da celulose, hemicelulose e lignina, os materiais lignocelulósicos contêm outros componentes em menor grau, tais como resinas, taninos, ácidos graxos, etc. Compostos de nitrogênio na forma de proteínas também são encontrados em pequenas quantidades. Alguns sais de cálcio, potássio e magnésio são os mais frequentes (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura da lignina



Fonte: BOER et al., 2005.

A estrutura da lignina fornece ainda mais força para as paredes celulares da planta, oferecendo uma barreira de defesa química e física, contudo, tende a dificultar a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono/açúcares. Existem diversas abordagens de pré-tratamento químico, que foram desenvolvidos com o intuito de remover a hemicelulose e lignina presentes na fonte de biomassa, a fim de aumentar a biodegradabilidade da celulose, e o rendimento de açúcares a partir da hidrólise enzimática aumentando assim o processo de conversão. (BADIEI et al., 2014).

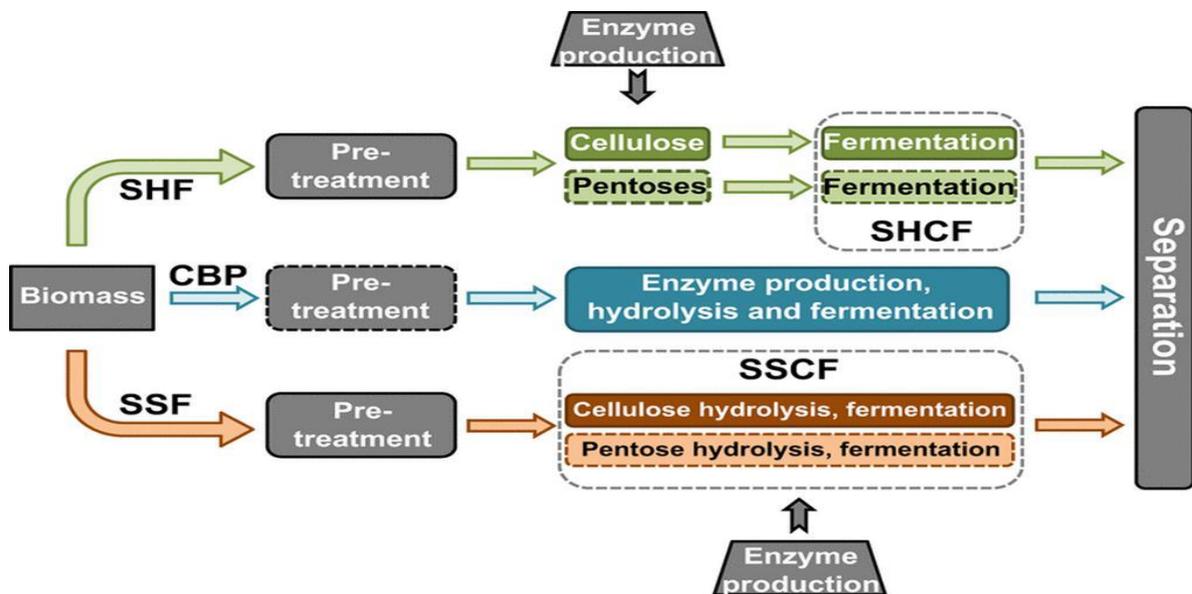
### 2.3 Produção de Etanol 2G

O Brasil possui condições excelentes para tornar realidade o uso deste combustível, seja um processo de etanol 1G totalmente consolidado, as diversas fontes de biomassa, bem como toda infraestrutura do etanol 1G, que pode ser aproveitado para a produção de diversos biocombustíveis em conjunto, entretanto existem barreiras técnicas que devem ser ultrapassadas a fim de tornar a produção de etanol 2G interessante do ponto de vista comercial. Entre essas barreiras, tem-se no Brasil o uso do bagaço de cana-de-açúcar como produção de energia por parte das usinas sucroalcooleiras como um dos maiores concorrentes do etanol 2G (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Podemos citar simplificadaamente alguns processos utilizados para a produção de etanol 2G, conforme o diagrama (Figura 6), onde SHF (Hidrólise e fermentação separados),

especificado em verde, é um processo com duas etapas que necessita um pré-tratamento para reduzir os entraves gerados após a parte sólida ser hidrolisada, celulose e lignina. O hidrolisado será então fermentado por organismos específicos, sejam pentoses ou hexoses SHCF (Hidrólise e co-fermentação separados). SSF (Sacarificação e fermentação simultâneas) é um processo mais rápido e eficiente, tendo nele presente um microrganismo capaz de realizar a co-fermentação de hexoses e pentoses do hidrolisado, SSCF (Sacarificação e fermentação simultâneas). E o CBP (Bioprocessamento consolidado), que é caracterizado pela produção da enzima, realização de hidrólise e fermentação num único estágio, sendo um processo de produção unificado que visa diminuir os custos. Utilizando microrganismos que sejam capazes de diminuir as dificuldades geradas durante a hidrólise. Buscando utilizar um único organismo que produza enzimas que venham a degradar a fonte do material lignocelulolítico que possibilite a fermentação de hexoses e pentoses (BLUMER-SCHUETTE et al., 2013).

Figura 6 - Estratégias para a produção de biocombustíveis de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica.



Fonte: BLUMER-SCHUETTE et al., 2013.

No processo de hidrólise enzimática, o agente catalisador é de origem biológica, e possui uma especificidade com o substrato, que é característico das enzimas, atuando num sistema do tipo chave-fechadura, o que acaba gerando um alto rendimento de açúcares que podem ser fermentáveis e promovendo assim menores impactos ambientais, que é extremamente importante na produção de biocombustíveis, num processo que por

característica é bastante econômico do ponto de vista energético. Entretanto, suas maiores desvantagens são os diversos parâmetros que devem ser controlados durante a execução do processo enzimático, o grande tempo que é necessário para que ocorra a reação e as altas concentrações de enzimas para que sejam alcançados níveis desejáveis de transformação de celulose, bem como os preços das enzimas (FANG et al., 2010).

Existem no Brasil alguns grupos que visam o uso de enzimas na produção de biocombustíveis, como o projeto Dedini Hidrólise Rápida (DHR, que ocorre pela quebra das moléculas de celulose pela adição de ácido sulfúrico aos resíduos) e a Bioflex 1, unidade industrial da GranBio que possui um conjunto de tecnologias (desenvolvimento de processos de fermentação e de hidrólise enzimática) que permite a partir de materiais oriundos da cana-de-açúcar a geração de um combustível renovável (CRUZ et al., 2016)

## 2.4 Enzimas

A utilização de enzimas não se encontra restrito somente a produção de bioetanol, diversas indústrias tem utilizado suas propriedades nos mais variadas produtos. As enzimas são utilizadas na clarificação de sucos de frutas, reduzem gastos com energia, melhoram cor e aromas e aumentam o rendimento. Indústrias alimentícias utilizam enzimas para diminuir a viscosidade da mistura de tais alimentos (Farinha láctea, mingau de milho, arroz e outros cereais). E ainda na indústria cervejeira elas são utilizadas para a conversão de determinados substratos em açúcares, controlam uma possível turbidez excessiva entre outros usos (BON, 2008).

As enzimas que são utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica em sua maioria são originárias de fungos, dada sua grande diversidade e uma elevada capacidade de produzirem enzimas, como as celulases e hemicelulases. Contudo, os fungos não são os únicos microrganismos fontes de enzimas. Tendo em vista que bactérias também possuem características parecidas de produzirem enzimas capazes de degradarem a biomassa. Diversos trabalhos visando o isolamento e caracterização de bactérias veem sendo estudadas devido a diversidade de microrganismos capazes de degradar a biomassa, e ainda por possuírem uma elevada atividade específica e ao contrario dos demais métodos enzimáticos (são bastante criteriosos, quanto as condições de reação) são menos exigentes quanto ao pH. (ADLAKHA et al., 2012).

O processo de degradação da celulose é totalmente natural e ocorre de forma espontânea no ciclo do carbono, pode ser continuada caso possua microrganismos presentes e que sejam especializados na degradação da madeira, seja por fungos ou bactérias, como alguns microrganismos simbióticos que por ventura são encontrados nos intestinos de muitos animais que se alimentam de plantas como as lagartas (WATANABE e TOKUDA, 2010; DANTUR et al., 2015).

A nomenclatura enzimática é bastante simples, e cada enzima recebe uma sequência numérica composta por quatro números (1º- Classe, 2º- Subclasse, 3º- Grupos químicos específicos presentes na reação, 4º- A enzima respectiva), e precedidos pelas letras “E.C.” (que provem de Enzyme Commission) (IUBMB, 2016).

A enzima celulase reúne um complexo de enzimas que envolvem endo-1,4- $\beta$ -glucanase (endoglucanase, EC 3.2.1.4), exo-1,4- $\beta$ -glucanase (exoglucanase, EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucanidrolase, EC 3.2.1.21) (SETTE et al. 2008; SAJITH et al. 2016).

Endoglucanase (endo -  $\beta$  - 1,4 - D - glucanase , endo -  $\beta$  - 1,4 - D - glucano glucano -4- hidrolase ) comumente chamada de CMCCase é capaz de hidrolisar a carboximetilcelulose (CMC) ou até mesmo a celulose numa mistura bastante utilizada. Com a atuação da Endoglucanase, irá ocorrer uma quebra da cadeia do polímero, o que irá resultar num aumento da concentração de açúcares redutores.

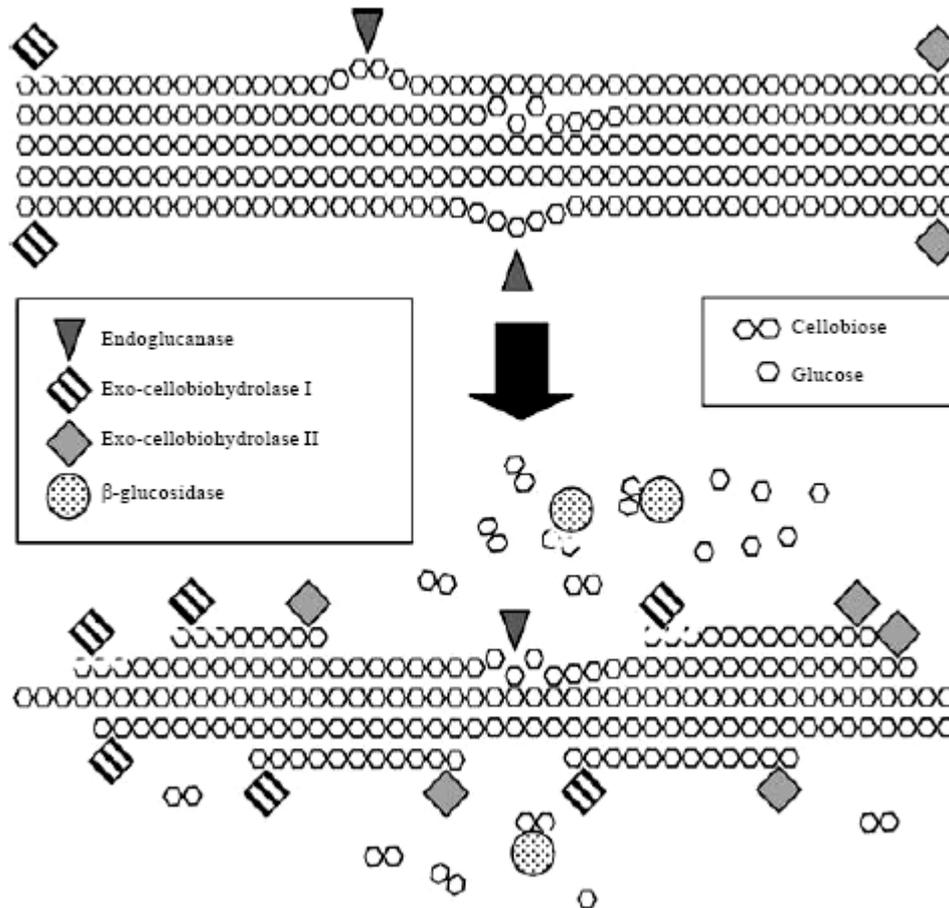
Exoglucanase (exo - 1,4 -  $\beta$  - D glucanase , celobiohidrolase ) degradam a molécula de celulose , quebrando e liberando unidades de celobiose pela extremidade não redutora presente na cadeia (SETTE et al., 2008; SAJITH et al., 2016).

A etapa final de hidrólise da celulose no processo é feito pela  $\beta$  – glicosidase, que conclui o processo pela fragmentação da celobiose e posterior retirada da glucose pela extremidade não redutora da cadeia (KUBICEK et al., 1993; SAJITH et al., 2016).

Na hidrólise da celulose o que ocorre é um processo com enzimas de diferentes atividades enzimáticas, isso com o objetivo de obter a partir da fonte de biomassa trabalhada uma molécula de glicose (Figura 7). Com isso primeiramente, as enzimas endo-B-glucanases atacam a espinha dorsal da celulose, ocasionando na retração da cadeia molecular, o que favorece na criação de diversas extremidades onde as exo-p-glucanases ataquem possibilitando a liberação da glucose. As exo-glucanases podem ocorrer de duas maneiras distintas, na primeira ocorre o ataque da extremidade redutora da cadeia da celulose, ao passo que na segunda ocorre ataques nas extremidades que não são redutoras. Por último, as cadeias que são curtas de glicose e que por ventura são liberadas após os ataques das exo-glucanases,

dímeros de celobiose, serão hidrolisados (quebrados) por uma  $\beta$ -glicosidase a unidades individuais (monómeros) de glicose (DANTUR et al., 2015).

Figura 7 - Representação esquemática do processo multi-enzimático envolvido na hidrólise da celulose.



Fonte: MALHERB E CLOETE, 2003; MURAD E AZZAZ, 2010.

### 2.5 *Helicoverpa armigera*

Esta espécie é bastante parecida com outras que são encontradas na Argentina (*Helicoverpa gelatopoeon*) ou até mesmo uma bastante conhecida que é uma praga na plantação do milho (*Helicoverpa zea*), que por ventura já existia no Brasil. Sua descrição inclusive havia sido descrita por Hübner, tendo ainda relatos de ataques em países como Austrália e Índia.

Este tipo de lagarta se alimenta principalmente de folhas e caules, podendo atacar brotos, frutos e vagens, ocasionando danos na fase vegetativa quanto reprodutiva. Seus indivíduos possuem grande mobilidade, o que acarreta numa facilidade para dispersar num amplo alcance, em torno de 1000 Km. Os custos anuais no mundo no combate e controle das perdas na produção giram em torno dos US\$ 5 bilhões. Países como Índia e China, usam

inseticidas, onde 50% são para o controle deste tipo de inseto. E na Espanha são uma das pragas que causam mais danos à indústria alimentícia, com maior número de relatos de ataque as plantações de tomate (ARNÓ et al., 1999; LAMMERS e MACLEOD, 2007).

Figura 8 - Vista lateral da *Helicoverpa armigera*.



Fonte: Dados do Autor, 2015.

A *H. armigera* trata-se de uma praga que ataca e causa danos econômicos a várias espécies de lavouras, possuem uma alta capacidade de dispersar seus indivíduos (mariposas) com um alto poder de reprodução (pode ovipositar de 1000 á 1500 ovos); elevada resistência a inseticidas e se adaptam facilmente a diferentes ambientes (REED, 1965).

## 2.6 Bioprospecção de Microrganismos

A bioprospecção de micro-organismos que sejam capazes de produzir enzimas com diversas propriedades é extremamente importante para o desenvolvimento de um processo biotecnológico. Este tipo de varredura vem sendo e/ou fora realizados tendo como ênfase a extração de enzimas em lagartas, fungos, caramujos e ate mesmo no solo, estando presentes nas mais diversas áreas. Trabalhos realizados utilizando-se técnicas como o sequenciamento genético, isolamento e caracterização de bactérias, com ênfase na produção de enzimas lignocelulolíticas (KOROIVA, 2011; DANTUR et al.,2015; GAUR, 2015).

A microbiota intestinal de diferentes insetos herbívoros possuem diferentes funções simbióticas, tendo como principais a fixação de nitrogênio, desnitrificação, a degradação de hidratos de carbono, desintoxicação e tendo diversas ações defensivas contra a atuação de patógenos (SCHLOSS et al., 2006; PITTMAN et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2013; SHAO et al., 2014).

Uma forma de obtenção seria a realização do isolamento dos microrganismos, que consiste na obtenção de uma cultura pura, visando isolar colônias de um microrganismo, separando-o de outros que por ventura se encontram no mesmo material, tendo em vista que o isolado faz parte de uma população mista.

Durante o processo de isolamento de um microrganismo é necessário mais que uma simples observação das características morfológicas para a sua identificação e classificação. Tomando todo cuidado referente aos materiais utilizados quanto à contaminação, tomando como base técnicas como semeadura (Consiste no plantio de um microrganismo em um meio de cultura, a partir de um material contaminado qualquer) e repique (Consiste na transferência de um microrganismo de um meio de cultura para outro) para a manutenção dos microrganismos isolados. (REIS JÚNIOR et al., 2002)

O uso de microrganismos na produção de enzimas fornece ótimas condições para os processos biotecnológicos, referentes à grande quantidade de enzimas produzidas com diferentes características, devido a fácil manipulação e mesmo em condições adversas não ocorrerão variações sazonais (SAID, PIETRO, 2002).

Os microrganismos são extremamente importantes do ponto de vista econômico, além de exercerem funções importantes de caráter ambientais. Estão presentes em diversos ciclos na natureza (Paul e Clark, 1996). Além das vantagens do ponto de vista ambiental e econômico, diversas indústrias tem se interessado pela busca de microrganismos que venham a serem introduzidos em áreas energéticas, biocatálise, produção de produtos naturais e etc (WULFF, CARRER e PASCHOLATI, 2006; KIM et al., 2008). No entanto, apesar das inúmeras vantagens, como por exemplo, um único microrganismo poder produzir várias enzimas, para que estes microrganismos sejam utilizados é necessário realizar técnicas de cultivo, identificação e enriquecimento do material desejado, seja métodos tradicionais ou as técnicas moleculares que vem facilitando em muito os trabalhos de ecologia microbiana, onde a biologia molecular é de suma importância nestes trabalhos (AMPOFO, CLERK, 2003).

## 2.7 Técnicas moleculares

Existe uma grande necessidade da obtenção de técnicas baratas, rápidas que sejam extremamente eficientes na obtenção da molécula de DNA, tendo em vista que varias técnicas de identificação e detecção de diversos patógenos vêm sendo utilizadas. Estes tipos de técnicas estão em uso desde a década de 80, tornando possível a pesquisa na diversidade dos

microrganismos nos mais diversos ambientes. Principalmente levando em conta ao se tratar muitas vezes da detecção de patógenos, independente da comunidade microbiana presente e da complexidade da amostra em estudo (AMANN et al., 2001).

Os métodos moleculares tem como base o uso de biomarcadores, que são moléculas com regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões extremamente variáveis, que são específicas de cada um, para detecção e identificação dos respectivos microrganismos, sendo estas regiões variáveis consideradas a impressão digital de um determinado microrganismo (PACE et al., 1986).

Um dos principais biomarcadores utilizados é a molécula de RNA ribossomal (RNAr). Sabendo que o RNAr é uma molécula que se encontra no ribossomo, estrutura esta que é responsável pela síntese proteica estando presente em todas as células, sendo este um motivo de seu uso.

Afim da determinação das relações filogenéticas e da diversidade das comunidades microbianas utiliza-se a região 16S, a menor unidade dos ribossomos de seres procariontes, porém trabalha-se com a molécula do DNAr que é bem mais estável e de fácil manipulação, sendo possível por ela codificar o RNAr (MUYZER et al., 1993).

A técnica de eletroforese em gel de agarose é utilizada na biologia molecular para separar macromoléculas tais como proteínas e/ou ácidos nucleicos, baseado nas propriedades físicas como o tamanho, forma e carga elétrica. Na separação do DNA, é utilizada a eletroforese em gel de agarose que é submetida à passagem de uma corrente elétrica (LEE et al., 2012). Como a molécula de DNA possui grupos fosfatos de nucleotídeos, ao ser carregado negativamente elas tendem a migrar entre a malha de agarose para o polo positivo. O gel de agarose age como um filtro seletivo para DNA de diferentes tamanhos moleculares, separando-os em bandas específicas à medida que ocorre o espalhamento do material genético do um elétron negativo para o positivo (TEIXEIRA, 2013). As moléculas de menor tamanho de DNA migram mais rapidamente que moléculas maiores, e a distância percorrida está intimamente ligada a seu tamanho. O DNA pode ser visualizado por meio de irradiação de luz UV, a partir de substâncias como o brometo de etídio, sendo estimado pela comparação com a distância que ele percorreu através do gel por uma unidade de tempo, por meio de uma amostra com tamanho previamente conhecido (LEE et al., 2012).

Dentre as diversas técnicas de biologia molecular, uma das mais utilizadas atualmente tem sido a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que possibilita a amplificação de um fragmento específico da molécula de DNA milhares de vezes em questão de minutos,

técnica está que revolucionou a medicina, justamente por uma única molécula de DNA ser capaz de produzir milhares de cópias da molécula em estudo.

Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, esta técnica favorece *in vitro*, por meio de variações de temperatura o aumento de número de cópias de um determinado fragmento de DNA, algo que o organismo naturalmente realiza em condições fisiológicas. A partir do uso de nucleotídeos, sequências iniciadoras ou primers e a enzima polimerase, sendo possível obter uma sequência específica do ácido nucleico por meio da fita molde (BERMINGHAM e LUETTICH, 2003; BEJ, 2004).

Este processo de amplificação da molécula de DNA envolve por meio da variação de temperatura as etapas de desnaturação, anelamento e extensão. A Figura 9 ilustra os passos de um ciclo da replicação do DNA que consistem na desnaturação da molécula de DNA, onde ocorre a separação da dupla-fita, o anelamento dos *primers* e no final do processo a amplificação dos *primers*. (WALKER, RAPLEY, 1999; BROWN, 2006).

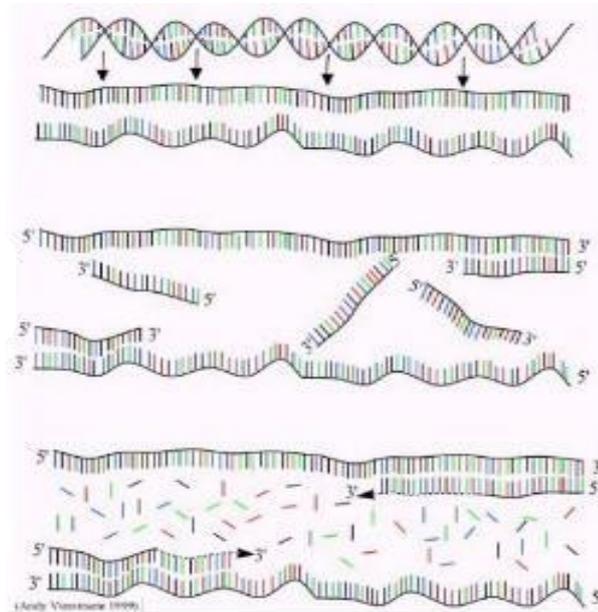
Figura 9 - Passos na replicação da molécula de DNA

3 Diferentes etapas:

1 - Desnaturação

2 - Anelamento

3 - Amplificação



Fonte: Adaptado de VIERSTRAETE, 1999.

Todo esse processo PCR envolve em torno de 30 ciclos que duram em média 3 horas, afim de que possa ter sido realizado todas as três etapas e por fim a amplificação da cadeia de DNA num crescimento exponencial. Podendo ser desenvolvida num equipamento chamado termociclador, que por sua vez, pode realizar as etapas de desnaturação e anelamento automaticamente devido às variações controladas de temperatura.

A partir da sequência de DNA dos isolados é possível por meio de programas específicos como o BLAST realizar a comparação da sequência mais próxima com o banco de dados NCBI e assim fazer a identificação mais próxima de sua espécie, ou caso seja uma espécie nova, podendo gerar assim uma árvore filogenética.

## 2.8 Fontes de biomassa

Tendo em vista os processos fermentativos e diversos modos de produção que por ventura poderão ser aplicados na produção do etanol 2G, escolheu a palma forrageira como matéria que venha a fornecer a matéria prima (Fonte de biomassa). Sua escolha se deve dentre vários fatores devido a grande quantidade que se encontra disponível na região nordeste do Brasil. Todavia, apesar da palma forrageira possuir diversos fins e aplicações, seus principais usos ficam condicionados a alimentação animal, não podendo esquecer que ela serve também pra outros fins, alimentação humana, seja na forma de doces, geleias, óleos, verduras, sucos, polpas e etc., produção de medicamentos (diuréticos, anti-inflamatórios, diabéticos e etc.), Cosméticos (xampus, cremes, sabonetes, loções para o corpo e etc.), adesivos, fibras, papel, corantes, entre outros. No Brasil, apesar dos diversos usos supracitados, a palma forrageira esta condicionada principalmente a alimentação animal (Pecuária).

A palma forrageira é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas, características estas presentes principalmente no nordeste brasileiro, além de possuir em sua composição química (Tabela 01) elevado teor de nutrientes e açúcares fermentescíveis, apresentando deste modo elevado potencial de produção em diferentes processos biotecnológicos (BARACHO et al., 2008)

No Brasil, especificamente na região nordeste, as espécies mais cultivadas são *Opuntia ficus-indica* Mill. (cv. Gigante (OP)) e *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck (cv. Miúda (NP)). Sendo no estado de Alagoas cultivado em maiores quantidades da *Nopalea cochenillifea* (cv. Miúda) (SANTOS et al., 2010).

Tabela 1 - Percentual de materiais lignocelulósicos e proteínas presentes em duas espécies de palma forrageira.

<b>Espécie</b>	<b>Lignina</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Celulose</b>	<b>Proteína Bruta</b>
Opuntia ficus- indica Mill (cv. Gigante (OP))	5,26	5,26	15,67	5,42
Nopalea cochenillifera Salm Dyck (cv. Miúda (NP))	3,57	12,84	16,40	4,31

Fonte: Adaptado de CAVALCANTE et al., 2014.

Tendo em vista o custo elevado de enzimas responsável por essa degradação dos materiais lignocelulósicos e o potencial dos componentes presentes na palma forrageira, busca por meio da bioprospecção de bactérias lignocelulolíticas no intestino de larvas da *Helicoverpa armigera*, identificar microrganismos e enzimas que possam degradar tais matérias e como tal, conseqüentemente, viabilizem o processo de produção do etanol de 2º geração.

### 3 JUSTIFICATIVA

Existe um grande interesse na obtenção de celulasas, devido seu vasto potencial de aplicação industrial, principalmente na indústria do bioetanol. A busca por enzimas que aumentem o processo de hidrólise intensifica a procura por novas fontes de biomassa e/ou a melhor utilização destes materiais como fontes de açúcares necessários no processo da fermentação. Sendo de grande valia para o setor biotecnológico a prospecção de microrganismos produtores de celulasas e estratégias que viabilizem o processo de produção e caracterização destas enzimas, tendo em vista o elevado preço das enzimas, bem como o desenvolvimento de estudos com diferentes condições e tipos de substratos, que resultara na maximização do processo biotecnológico.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias oriundas do trato intestinal de larvas da *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) e avaliar seu potencial celulolítico perante diversas fontes lignocelulósicas.

### 4.2 Objetivos Específicos

Pré-selecionar os melhores isolados produtores destas enzimas, utilizando o índice enzimático;

Identificar as bactérias celulolíticas através do sequenciamento genético empregando técnicas de biologia molecular (PCR) através de extração de DNA e eletroforese em gel de agarose;

Estabelecer as condições de produção de enzimas celulolíticas;

Determinar a atividade catalítica das celulases, hemicelulases e atividade endocelulolítica produzidas pelas bactérias celulolíticas;

Verificar o perfil cinético a partir de curva de crescimento bacteriano;

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local do experimento e descrição do sistema

As larvas de *Helicoverpa armigera* foram coletadas no Centro de Ciências Agrárias (CECA – Laboratório de Fitopatologia), Universidade federal de Alagoas, Rio Largo - Brasil, e colocadas numa dieta à base de palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*).

As análises e experimentos foram realizados em dois locais distintos, a etapa inicial foi no LTBA (Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos), localizado no CTEC (Centro de tecnologia), campus da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió – Brasil, e posteriormente no laboratório de microscopia e genética de microrganismos localizado no Centro de Ciências Agrárias.

### 5.2 Procedimentos adotados para as análises

#### 5.2.1 Isolamento de bactérias celulolíticas

As larvas foram esterilizadas utilizando uma solução de etanol a 70%. Após realizar sua assepsia, foram dessecadas e seu intestino foi cortado em pequenos pedaços, e homogeneizados numa solução salina isotônica (NaCl 0,9%) antes do correto plaqueamento, que foi realizado em meio sólido ágar salina mínimo contendo 0,5% de glicose, bagaço de cana-de-açúcar finamente moído como suas únicas fontes de carbono (conforme Tabela 2). Em seguida, as colônias bacterianas que cresceram em celulose como fonte de carbono foram isoladas e purificadas para determinar a capacidade de degradação de celulose (DANTUR et al., 2015).

Tabela 2 - Composição do meio de triagem em placas de Petri.

Componentes	Concentração (g.L-1)
NaHPO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,05
NaCl	3,0
CaCl <sub>2</sub>	0,05
Agar	20,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0

Fonte: Dados do autor, 2016.

A técnica utilizada para o isolamento foi a de “Estrias Múltiplas”, a qual consiste em espalhar o material com o auxílio de uma alça bacteriológica, realizando estrias sucessivas até que se esgote o material, possibilitando um perfeito isolamento das bactérias presentes na amostra.

### 5.2.2 Extração e Quantificação do DNA em gel de Agarose

Este é um método eficiente para extração de DNA de bactérias, que não necessita de enzimas, fazendo-se uso do carbonato de silício para quebrar da parede celular da bactéria (ROSA, 2008).

A eletroforese para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 0,8%. Após 50 minutos em eletroforese a 90 voltz, o gel foi tratado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation), conforme instrução do fabricante, e visualizado em um aparelho transiluminador com luz UV.

### 5.2.3 Método de coloração com Vermelho Congo

A solução de vermelho do Congo, uma solução corante, é bastante utilizada como um indicador para verificação de degradação num meio que contenha ágar e uma fonte de carbono na presença de bactérias fornecendo um teste rápido, eficaz e sensível da presença de bactérias celulolíticas, conseguindo demonstrar a capacidade de alguns microrganismos de degradarem polissacarídeos, devido a forte interação do corante com os polissacarídeos com ligações  $\beta$ -1,4 – D-glucopiranosil. Podendo reduzir tempos (dias ou até meses) de incubação para bem menos de 1 dia, um método extremamente adaptável, direto e utilizado em testes com diferentes tipos de microrganismos (TEATHER e WOOD, 1982).

Através dos isolados obtidos, aqueles produtores de celulasas ao interagir com o corante observou-se um halo de cor clara com as bordas levemente laranja, indicando áreas de hidrólise. Este halo foi medido para a obtenção do índice enzimático. Os diâmetros das colônias e de hidrólises produzidos foram medidos com paquímetro (NOGUEIRA e CAVALCANTI, 1996). Os índices enzimáticos foram calculados a partir da relação entre os halos de hidrólise ( $\emptyset c$ ) e halos da colônia ( $\emptyset h$ ), fornecendo assim os valores referentes aos índices enzimáticos (IEA).

#### 5.2.4 Determinação da atividade catalítica das celulasas

As bactérias foram crescidas utilizando o meio líquido de Luria-Bertani (LB), e com isso vinte microlitros (20 µl) de uma suspensão de bactérias foram inoculados em diferentes pontos sobre a superfície em placas contendo meio salina mínimo suplementando com 0,5% (w/v) de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de palma e farelo de soja (Palma e soja finamente moídas). Em seguida, as bactérias foram cultivadas durante quinze dias (15 dias) a uma temperatura de 30°C, posteriormente coradas com vermelho Congo 0,1% (w / v), para determinar a possível degradação de celulose. Sendo possível a partir do diâmetro da zona límpida em torno da gota onde fora aplicado a suspensão bacteriana, indicando a grandeza da atividade celulolítica (DANTUR et al., 2015). No experimento foram utilizados 30 mL de meio por placa, podendo realizar três furos por placa de petri (135mm).

#### 5.2.5 Atividade de CMCase extracelular

Este é um método que apesar de ser qualitativo é extremamente importante por representar a dosagem de endoglucanases podendo ser evidenciado pelo halo formado perante a degradação da carboximetilcelulose.

A suspensão de crescimento bacteriano foi inoculada em diferentes áreas em placas contendo 0,1% de glicose, 0,5% (w/v) de CMC. As placas foram incubadas a 30°C durante 10 dias e subsequentemente coradas com vermelho do Congo 0,1% (w / v), para visualizar a atividade de endoglucanases extracelular. O índice de atividade enzimática foi calculado como o diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro da colônia, medidos a partir de paquímetro (HUANG et al., 2012).

#### 5.2.6 Teste de atividade enzimática endocelulolítica

As células bacterianas foram crescidas em meio médio salino suplementado com 0,2% glicose, 0,2% triptona e 0,5% (w/v) CMC e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida as bactérias foram inoculadas em meio líquido salino mínimo contendo diferentes fontes de

carbono e incubados por um período de 14 dias em shaker/incubador numa rotação de 150 rpm e 30°C. Durante o período de incubação, foram retiradas amostras em diferentes tempos.

A atividade enzimática endocelulolítica foi determinada utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Esta reação consiste em 100 µl de 2% (w/v) CMC em tampão 100 mM de acetato de sódio (pH 5,0), com adição de 100 µl dos sobrenadantes do extrato bruto de proteínas, que foram adicionados antes da incubação a 40°C. A reação foi parada com adição de 200 µl do reagente DNS e a mistura foi aquecida a 100°C durante 10 minutos. Após a reação atingir a temperatura, foi resfriada em banho de gelo e em seguida, lida a absorbância em 540 nm, onde foi medida utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV - Visível 1280 (DANTUR et al., 2015). Os ensaios foram executados em triplicata.

### 5.2.7 Curva de Crescimento Bacteriano

Após o isolamento da bactéria, foi realizada uma curva de crescimento bacteriano. A bactéria foi inoculada num meio Agar líquido de Luria Bertame suplementado com glicose 0,5% e a cada 60 minutos foram realizadas leituras para observar seu comportamento. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 640 nm, sendo assim possível determinar a curva de crescimento a partir da densidade óptica. Para realização do experimento o meio foi adicionado numa solução salina a 0,9% (Cloreto de Sódio, NaCl). Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada 60 minutos, ao longo das 32 horas de incubação do meio inoculado, a 37°C sobe agitação constante de 150 rpm. Um frasco contendo o meio estéril (Branco) foi utilizado ao longo do experimento para zerar o espectrofotômetro durante a leitura e avaliação da densidade óptica (SANTIAGO et al., 2015).

### 5.2.8 Análise de Dados

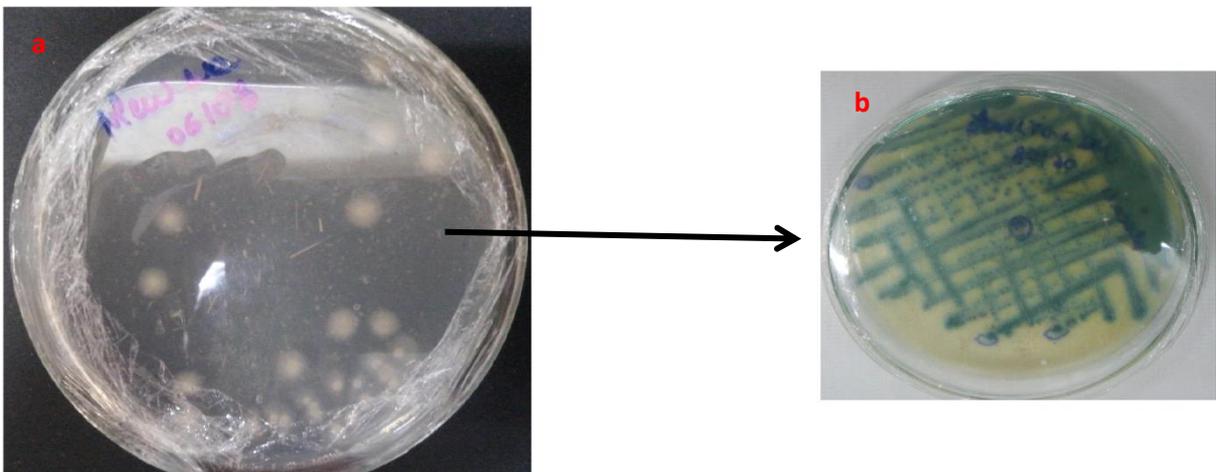
A análise estatística das atividades enzimáticas foram realizadas de acordo com um delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições. Os dados foram analisados utilizando o software PAST versão 3.14 (HAMMER et al., 2001).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Isolamento de bactérias celulolíticas

A partir das larvas coletadas para a pesquisa (N = 15), apenas nove (09) delas se alimentaram de palma forrageira, alimento este que foi utilizado como fonte de carbono, as quais foram dessecadas obtendo-se três (03) isolados bacterianos em meio salina mínimo suplementado com bagaço da cana-de-açúcar como única fonte de carbono, conforme Figura 11. Os isolados foram utilizados para as etapas subsequentes, visto que apresentaram ser capazes de produzir enzimas do complexo celulolítico a partir de materiais lignocelulósicos. Essas culturas bacterianas foram mantidas em meio sólido ágar salina mínimo contendo como fontes de carbono carboximetilcelulose e glicose a 37 °C sob refrigeração até o momento do uso.

Figura 10 - Isolados obtidos do microrganismo (cultivados em meio salina mínimo (placa a) e repicados em meio ágar orientation (placa b)).



Fonte: Dados do Autor, 2015.

Dos 3 isolados bacterianos selecionados, estudados neste trabalho obtidos a partir da degradação do meio SM suplementado com glicose e cana-de-açúcar, apenas 2 mostraram-se produtores de enzimas por meio dos testes de hidrólise e de atividade enzimática, demonstrando que esses microrganismos são os responsáveis por fazer a biodigestão dos

materiais lignocelulolíticos ingeridos pelas larvas, assim como tem descrito Dantur et al. (2015).

Em comparação a outros estudos, a quantidade de isolados obtidos foram inferiores, como Huang et al. (2012), que isolou 207 bactérias do intestino de larvas de *Holotrichia parallela*. Bem como, Khianggam et al. (2014), isolou 10 bactérias produtoras de celulase a partir de 7 amostras da farinha de óleo de palma da Tailândia.

## 6.2 Ensaio de Atividade Extracelular

Os isolados que obtiveram crescimento no meio de bagaço de cana-de-açúcar foram selecionados para os ensaios de atividade extracelular CMCase e extracelular total.

Para os ensaios do índice de atividade enzimática (IEA) observou-se redução na velocidade de formação do halo com seis (06) dias de inóculo, ademais, o crescimento da colônia mostrou-se mais rápido quando comparado com a produção das celulases. Como a quantidade de açúcares no início do inóculo são grandes, sendo mantidas as condições do meio, a tendência é que as colônias de bactérias adaptadas continuem a crescer induzindo a produção de enzimas para utilizar as fontes de carbono.

É importante salientar que os testes aplicados utilizando a solução de vermelho congo, foram somente de natureza qualitativa, evidenciando a hidrólise por meio do halo de degradação, conforme Figura 12, não servindo como natureza quantitativa para as atividades enzimáticas. Levando em conta as diversas variações que foram realizadas durante o experimento, os resultados de IEA demonstraram-se distintos sob as mesmas condições de temperatura, tempo de incubação e concentração dos substratos utilizados.

Figura 11 – Ensaio de atividade celulolítica qualitativa do isolado bacteriano.



Fonte: Dados do autor, 2016.

Destacando que houve produção de enzimas, evidenciado pela presença do halo de hidrólise, da mesma maneira que o método de detecção foi eficiente. Tendo em vista que a visualização do halo esta atrelada a diversos aspectos, como: parâmetros químicos e físicos, fatores biológicos, pH e temperatura, contaminantes que possam interagir com o vermelho de congo fornecendo falsos resultados e até mesmo inibindo a ação da enzima (VASCONCELOS et al., 2003; COLEN, 2006).

### 6.3 Determinação da atividade catalítica das celulases

O que pode tornar um processo de hidrólise enzimática economicamente viável é o processo de produção de celulases, sendo primordial detectar a atividade catalítica. Na figura 13, estão ilustrados os resultados de atividade extracelular a partir de diferentes substratos, realizados sob as mesmas condições de cultivo (RAMACHANDRA et al., 1987).

Figura 12 - Imagens do halo da colônia e halo da hidrólise, suplementados com bagaço de cana-de-açúcar (a), farelo de palma forrageira (b) e farelo de soja (c).



Fonte: Dados do autor, 2016.

È importante destacar que apesar dos estudos da utilização de farelo de palma e soja ser poucos, o principal foco destas biomassas são a alimentação e pecuária, nota-se que podem ser um ótimo substrato para a produção de enzimas celulolíticas.

A Tabela 3 apresenta os resultados das medidas dos halos da colônia ( $\varnothing_c$ ) e halos de hidrólise ( $\varnothing_h$ ) com seus cálculos dos índices enzimáticos (IEA), onde foi possível por meio da relação determinar que os valores mais elevados foram observados nos suplementos de farelo de soja (8,69) e farelo de palma (6,72), sendo o bagaço de cana-de-açúcar (4,79) aquele que apresentou os menores valores. Os valores apresentados correspondem aos experimentos

realizados independentemente nas mesmas condições. É importante também observar qual o tamanho e como se deu o crescimento da colônia na placa, observando que apesar do substrato de bagaço de cana-de-açúcar ter apresentado o menor valor de degradação para índice enzimático posteriormente será possível notar que tiveram os resultados superiores para atividade enzimática endocelulolítica.

Tabela 3 - Índice de atividade enzimática (IEA) calculada após 14 dias de cultivo dos isolados com diferentes suplementos.

<b>Substratos</b>	<b>Média Øh</b>	<b>Média Øc</b>	<b>I.E.A</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Farelo de Soja</b>	3,48	0,40	8,69	1,32
<b>Farelo de Palma</b>	2,69	0,40	6,72	1,37
<b>Bagaço de cana-de-açúcar</b>	1,92	0,40	4,79	0,18

Øc= diâmetro da colônia (mm); Øh= diâmetro do halo (mm); I.E.A= índice enzimático; Ø=halo do diâmetro da placa de Petri (135 mm).

Fonte: Dados do autor, 2016.

Para o desenvolvimento dos microrganismos, há a necessidade de nutrientes específicos sob determinadas quantidades e condições, como por exemplo, as fontes de nitrogênio, seja ureia, extrato de levedura ou peptona, que segundo Mandels e Weber (1969) a depender de suas quantidades e tipo utilizado intensifica a atividade de celulase total. Tais estudos levaram a Khowala e Sengupta (1992) relatar que fungos *A. niger* foram seletivos a pontos de promover um maior crescimento de acordo com o suplemento de nitrogênio utilizado: (Ureia) > (Peptona) > (NaNO<sub>3</sub>) > (Extrato) de levedura. A degradação gerada na placa pelos microrganismos apresentou tamanho considerável, o halo de degradação, com isso optou por um cortador que tivesse 4,0 mm de diâmetro.

O uso destes tipos de biomassa, farelo de soja e palma, pode suplementar o uso de nitrogênio e até mesmo alguns minerais, tendo em vista que possuem uma vasta composição nutricional, haja vista, os meios de cultura representam grande quantidade dos custos na produção das enzimas, tornando extremamente importante o uso de resíduos agrícolas (BON, FERRARA, CORVO, 2008).

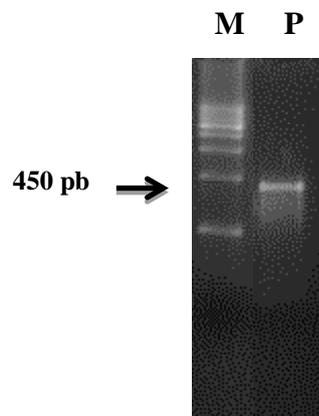
Os resultados de IEA foram superiores aos obtidos por Khianggam et al. (2014), que a partir de amostras da farinha de óleo de palma da Tailândia, obtive índice enzimático por meio de hidrólise que variaram de 1,56 até 4,14. Vale ressaltar que Tanaka et al. (2006),

demonstra que uma dieta com uma variação de diferentes fontes de carbono, resulta na obtenção de diferentes comunidades microbianas.

#### 6.4 Extração e Quantificação do DNA Bacteriano

Os dados ilustrados na Figura 14 demonstraram a obtenção do DNA molde que é utilizado para sequenciamento e por meio deste a identificação da sequência do DNA por BLAST para identificação da espécie do microrganismo. A eficiência da extração do DNA genômico purificado pode ser evidenciada com a obtenção da eletroforese em gel de agarose, haja vista o tamanho amplificado do fragmento do gene de 16S rRNA foi de aproximadamente 450 pb (conforme a seta indicando).

Figura 13 – Produto de PCR (DNA bacteriano) em gel de agarose 0,8%; onde P é o DNA da amostra, M é o marcador (KBr) de peso molecular 1500 pb, produto da reação de PCR com os oligonucleotídeos da região do gene 16S rDNA.



Fonte: Dados do autor, 2016.

Na ampliação dos genes 16S rDNA foi realizada a técnica de PCR, onde os resultados obtidos não foram satisfatórios, tendo em vista que os primers utilizados não resultaram em reações de incorporação de nucleotídeos. Devido a isto, acredita-se que tenha ocorrido a formação de fragmentos inespecíficos menores do que o esperado, que a quantidade de DNA-molde e/ou primer tenham sido muito baixas, baixa qualidade de pureza do produto de PCR, como a presença de proteínas e polissacarídeos e degradação das amostras. Sendo assim, torna-se necessário realizar alguns ajustes na análise como a quantificação do DNA-molde extraído, avaliar outros primers para a reação de PCR utilizados no sequenciamento de DNA bacteriano, e ajustes na temperatura de anelamento bem como na de extensão. Isto irá

possibilitar uma melhor resolução taxonômica, podendo relacionar de modo correto os isolados em consonância as espécies-tipo, ou determinando a ocorrência de novas espécies (BEJ, 2004).

O processo de sequenciamento é extremamente importante, pois através dele é possível identificar quais microrganismos estão presentes na microbiota intestinal das mais variadas espécies de animais, principalmente se forem espécies não relatadas na literatura (SHARMA e CARLSON, 2000).

#### 6.5 Atividade de CMCase extracelular

Os resultados obtidos com o presente isolado obteve valores de 4,58 de índice enzimático com a atividade CMCase celular, ilustrado conforme Tabela 4. Apresentando resultados superiores a alguns estudos, levando-se em conta que segundo Lopes et al., (2011) uma bactéria com um índice enzimático acima de 2,5 é considerada como produtor de enzimas. Estudos como de Chang et al. (2009), obtiveram atividade de dois isolados de *Bacillus* sp. na presença de CMC 0,5%, com índices de 1,9 e 2,33 e Ramachandra et al. (1987), obteve índices de 1,58, 1,33, 2,4 respectivamente, resultados menores que os apresentados neste estudo.

Figura 14 - Halo de crescimento de atividade CMCase extracelular



Fonte: Dados do autor, 2016.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos dos índices de atividade enzimática obtidos após o cultivo em meio SM suplementado com CMC, após 10 dias de incubação à 30°C em estufa de cultura bacteriológica. Os valores obtidos com a CMCase celular evidenciaram um índice enzimático de 4,58, demonstrando possuir atividade catalítica para degradar CMC.

Tabela 4 – Índice de atividade enzimática calculado após 10 dias de incubação para atividade CMCase extracelular.

<b>Suplemento</b>	<b>Média Øh</b>	<b>Média Øc</b>	<b>I.E.A</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>CMC</b>	1,83	0,4	4,58	0,71

Øc= diâmetro da colônia (mm); Øh= diâmetro do halo (mm); I.E.A= índice enzimático; Ø=halo do diâmetro da placa de Petri (135 mm).

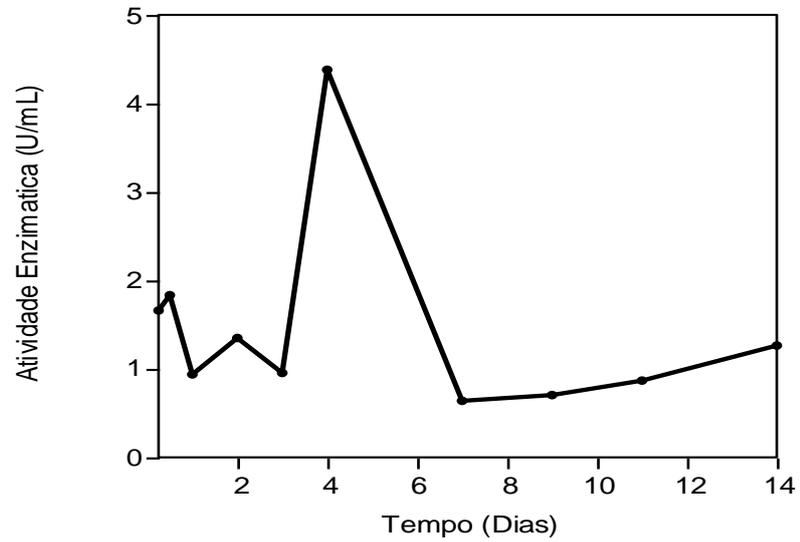
Fonte: Dados do autor, 2016.

## 6.6 Testes de atividade enzimática endocelulolítica

### 6.6.1 Atividade enzimática utilizando diferentes substratos

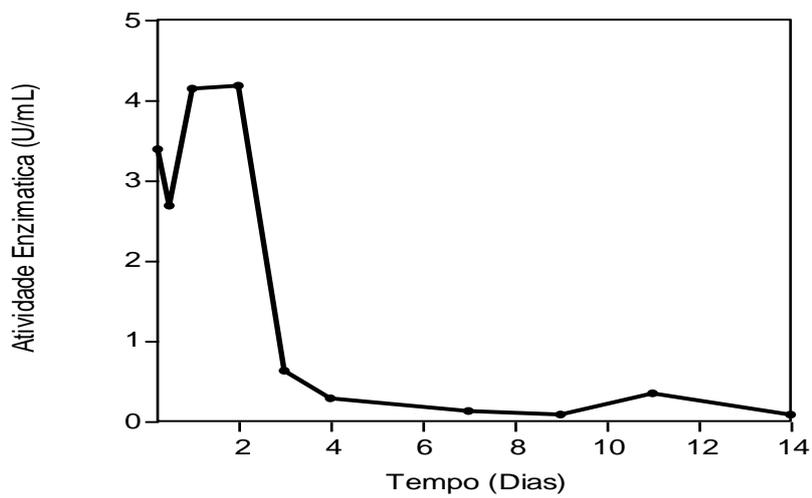
As Figuras 15, 16, 17 e 18 demonstram a atividade dos diferentes substratos utilizados no estudo de atividade enzimática endocelulolítica, CMC, Bagaço de cana-de-açúcar e celulose respectivamente. Apesar de terem apresentado valores satisfatórios de atividade catalítica das catalases, outros substratos como farelo de soja e de palma foram utilizados, entretanto, por não apresentarem resultados esperados, nas condições executadas no presente estudo, apresentaram valores negativos, sendo descartados.

Figura 15 - Atividade enzimática endocelulolítica utilizando CMC como substrato.



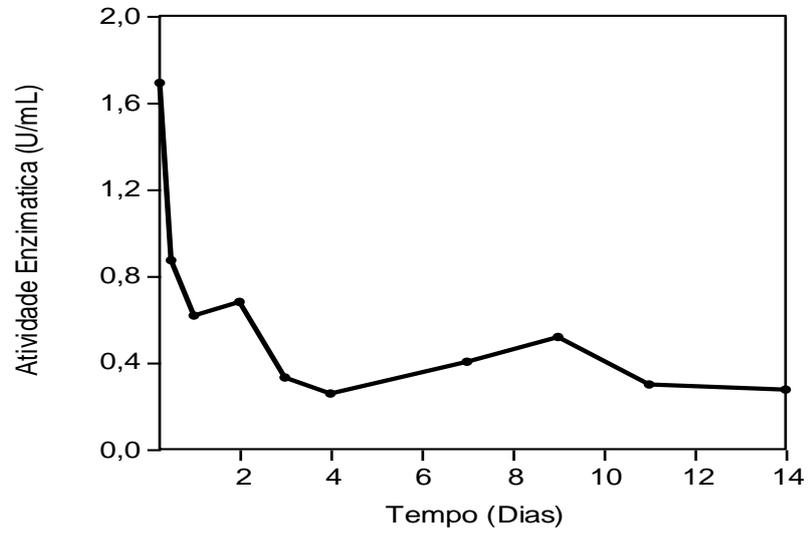
Fonte: Dados do Autor, 2016.

Figura 16 - Atividade enzimática endocelulolítica utilizando Bagaço de cana-de-açúcar como substrato.



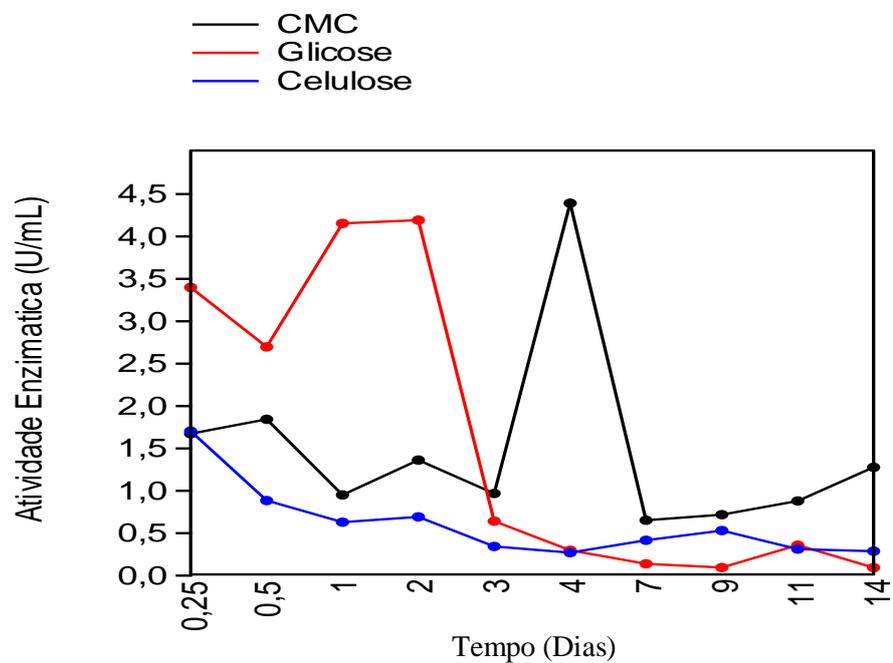
Fonte: Dados do Autor, 2016.

Figura 17 - Atividade enzimática endocelulolítica utilizando celulose como substrato.



Fonte: Dados do Autor, 2016.

Figura 18 - Estudo comparativo da atividade enzimática endocelulolítica utilizando diferentes substratos.



Fonte: Dados do autor, 2016.

É possível notar a partir da Figura 18, que o meio suplementado com celulose apresentou baixo valor, com pequena variação da atividade enzimática. No entanto o meio cultivado com CMC, apresentou-se praticamente constante nos três (03) primeiros dias, revelando um pico de atividade no quarto dia, e em sequência reduziu aos valores iniciais. Todavia o meio suplementado com glicose, foi o que se apresentou mais estável nas horas iniciais do primeiro (1º) e segundo (2º) dia, demonstrando um maior tempo de ativação da enzima no meio supracitado, fator primordial para o uso das enzimas em processos biotecnológicos.

Através da quantificação da atividade enzimática endocelulolítica foi possível determinar o melhor tempo de cultivo para a produção das enzimas assim como o melhor substrato utilizado. A partir do isolado testado foi possível observar que apesar do pico de atividade enzimática utilizando CMC como substrato no 4º dia ter apresentado  $4,38 \text{ U.mL}^{-1}$ , os mais representativos e estáveis foram observados na utilização do bagaço de cana-de-açúcar, onde apresentou valores de  $3,38 \text{ U.mL}^{-1}$ ,  $4,14 \text{ U.mL}^{-1}$ ,  $4,18 \text{ U.mL}^{-1}$  (6 horas, 1 e 2 dias respectivamente).

A rápida resposta das enzimas e seus valores de atividades sob o substrato de cana-de-açúcar reportam dados cinéticos significativos durante os dois primeiros dias de análises (6 horas –  $3,38 \text{ U.mL}^{-1}$ , 12 horas –  $2,68 \text{ U.mL}^{-1}$ , 1 dia  $4,14 \text{ U.mL}^{-1}$ , 2 dias  $4,18 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Embora o substrato de CMC no seu 4º dia ter apresentado o valor mais acentuado, observa-se que foi um pico único comparando-se aos demais valores de atividade enzimática. Apesar de os valores apresentados estarem na forma de unidade enzimática por mL, entende-se que uma U foi definida como aquela que libera um  $\mu\text{mol}$  do açúcar redutor correspondente, por minuto, nas determinadas condições do experimento, assim como relatam Xiao et al. (2004).

É importante salientar que um dos fatores primordiais na produção das enzimas é a escolha ideal do substrato, tendo em vista que a otimização do mesmo aliada a outras condições (umidade, temperatura, pH, concentração) resultará em resultados enzimáticos mais significativos, assim como pode gerar produtos indesejáveis (KULKARNI e SHENDAY, 1999).

## 6.7 Curva de Crescimento Bacteriano

Durante o crescimento do isolado bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias apresentaram uma curva de crescimento padrão, onde pode ser expresso por meio da

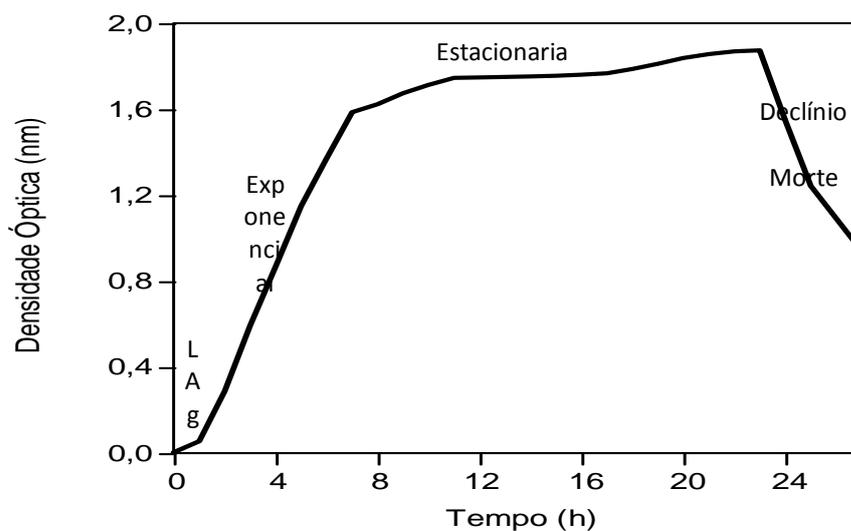
densidade óptica ao longo de 32 horas de incubação. Sendo que o isolado bacteriano apresentou pico de crescimento até às 23 horas.

Vale salientar que é possível notar que a densidade óptica do meio de cultura é considerada um método eficaz para se estimar a quantidade de crescimento bacteriano do isolado somente até as 23 de crescimento para este estudo, pois, a turbidimetria não consegue discriminar células vivas e mortas, sabendo que as células microbianas dispersam a luz, que podem assim serem detectadas por meio de medição de absorbância em um espectrofotômetro (PINTO et al., 2010).

O crescimento ocorreu de forma mais acentuada durante o intervalo de 2 à 6 horas, onde as células dos microrganismos se multiplicam intensamente chamado de fase exponencial. Durante os intervalos de 7 a 22 horas observa-se a estabilização do crescimento bacteriano, designado por fase estacionaria. Todavia a partir das 23 horas os microrganismos iniciam a fase de declínio ou morte, demonstrando que nas condições empregadas no experimento eles tiveram um período de vida de 23 horas.

A Figura 20 demonstra o crescimento das células do isolado durante 32 horas. E suas respectivas fases de crescimento e declínio.

Figura 19 - Estudo da cinética de crescimento bacteriano do isolado em estudo.



Fonte: Dados do autor, 2016.

Entender a cinética de crescimento bacteriano é extremamente importante para que se possa compreender o comportamento do crescimento dos microrganismos em estudo, mesmo que este método não demonstre por via óptica a diferenciação das células vivas e mortas.

Este tipo de experimento fornece as melhores condições de tempo necessárias às quais devem ser empregados estes microrganismos, principalmente nos momentos de maior intensidade celular e na fase de declínio ou morte.

## 7 CONCLUSÕES

Devido as limitação do trabalho a quantidade de microrganismos isolados no presente estudo foi de apenas uma espécie bacteriana.

O índice enzimático obtido com a atividade CMC<sub>Case</sub> celular foi de 4,58, bem superiores aos considerados (2,5 cm) como produtores de enzimas.

O processo de extração e purificação do DNA do isolado demonstrou após elucidação que o material íntegro surgiu como uma banda definida referente aos 450 Bp do material.

A maior atividade enzimática observada foi com CMC como substrato no 4º dia (4,38 UI.mL<sup>-1</sup>), contudo os resultados mais significativos foram observados com o uso do bagaço de cana-de-açúcar como substrato (3,38 UI.mL<sup>-1</sup>, 4,14 UI.mL<sup>-1</sup>, 4,18 UI.mL<sup>-1</sup>) obtidos nos dois primeiros dias de análises.

O estudo da cinética bacteriana reportou intenso crescimento entre 2 às 6 horas (fase exponencial), com estabilização entre 7 às 22 horas (Fase estacionaria) e declínio acentuado a partir das 23 horas (fase de declínio ou morte), caracterizando que nas condições empregadas no experimento o isolado bacteriano apresentou período de vida de 23 horas.

Em razão de o substrato ter grande importância num processo de produção de enzimas o uso das diferentes fontes de carbono empregadas neste trabalho mostrou-se promissora na produção de microrganismos celulolítico, a partir dos valores de atividade enzimática apresentados, podendo concluir que o microrganismo deste presente estudo tem potencial para serem utilizadas em processos industriais.

## 8 PERSPECTIVAS

- É necessário realizar o sequenciamento de DNA dos isolados extraídos do trato intestinal da larva em estudo, para que possa ser determinado os microrganismos que por ventura estejam descritos ou não na literatura por meio da comparação com os sequenciamento que se encontram depositados no GeneBank (NCBI).
- Avaliar as melhores condições de atividade enzimática sob a influência de diferentes condições de temperatura, pH e quantidade de substratos.

## REFERÊNCIAS

ARNÓ, J. et al. Integrated pest management for processing tomatoes in the Ebro Delta (Spain). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 487, n. 1, p. 207-212, 1999.

ADLAKHA, N. et al. Specific fusion of -1,4-Endoglucanase and -1,4-Glucosidase enhances cellulolytic activity and helps in channeling of intermediates. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 20, p.7447–7454, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01386-12.

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. **Current opinion in microbiology**, v. 12, p. 231-236, 2001.

AMPOFO, J. A.; CLERK, G. C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. **Aquaculture research**, v. 34, n. 8, p. 667-675, 2003.

BADIEI, M.; ASIM, N.; JAHIM, J. M.; SOPIAN, K. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. 2014. 5th International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering - ICBEE 2013, New Delhi, India, 14-15 September 2013 and 2nd International Conference on Civil Engineering - ICCEN 2013, Stockholm, Sweden, 13-14 December 2013. **Journal APCBEE Procedia**, 2014. Vol. 9 pp. 170-174. ISSN: 2212-6708. DOI:10.1016/j.apcbee.2014.01.030.

BAI, H. et al. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 528-540, 2013.

BARACHO, T. H. A.; SILVA, F. L. H.; TORRES NETO, A. B. Utilização de matérias primas lignocelulósicas para produção de álcool etílico: estudos da hidrólise ácida da palma forrageira Área temática: Processos Biotecnológicos 7e da destilação do hidrolisado fermentado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7, 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia. 2009.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource?, **Biodegradation**, v.3, p. 171-188, 1992.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology review**, v.13, p.25-58, 1994.

BEJ, A. K. Detection of microbial nucleic acids by polimerase chain reaction in aquatic samples. In: AKKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D. V.; BRUIJN, F. J. de. **Molecular microbial ecology manual**. 2. ed. Dordrecht; Boston; Londres: Kluwer Academy Publishers, 2004. p. 369-432.

BISPO, A. S. R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. 2010, f. 107. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas - Ba, 2010.

BLUMER-SCHUETTE, S. E. et al. Thermophilic Lignocellulosic Deconstruction **FEMS microbiology review**, v. 38, p. 393-448, 2013. Doi: 10. 1111/1574-6976.12044.

BOER, C. G. et al. Purification and some properties of Mn peroxidase from *lentinus edodes*. **Process biochemistry**, v. 41, p. 1203-1207, 2006.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. **Interciência Brasil**. p. 241-271, 2008

BON, E.; FERRARA, M.; CORVO, M. Enzimas em biotecnologia. **Rio de Janeiro, Editora Interciencia Brasil**. p. 508. 2008.

BROWN, T. Gene cloning and DNA analysis. 5. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, P. F. **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro**. 2013. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Minas gerais, 2013.

CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesquisa agropecuária tropical**, Goiânia/GO, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.

CHANG, C. C. et al. Activity of cellulase from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from *Brassica* waste compost. **Scientia agricola**, Piracicaba/SP, v. 66, n. 3, p. 304-308, jun. 2009.

CHENG H, WANG L. Lignocelluloses feedstock biorefinery as petrorefinery substitutes. In: MATOVIC, M. D. (Ed.). **Biomass Now: sustainable growth and use**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. Doi: 10.5772/51491. ISBN: 978-953-51-1105-4. Disponível em: [www.intechopen.com/books/biomass-now-sustainable-growth-and-use/lignocelluloses-feedstock-biorefinery-as-petrorefinery-substitutes](http://www.intechopen.com/books/biomass-now-sustainable-growth-and-use/lignocelluloses-feedstock-biorefinery-as-petrorefinery-substitutes) > Acesso em: 08 de janeiro de 2016.

CRUZ, C. H. et al. **Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro**. São Paulo: Blucher, 2016. 224 p.

DANTUR, K. I. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of diatraea saccharalis larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB express**, v. 5, 2015. DOI 10.1186/s13568-015-0101-z.

DWIVEDI, P.; ALAVALAPATI, J. R. R.; LAL, P. Cellulosic ethanol production in the United States: conversion technologies, current production status, economics, emerging developments. **Energy for sustainable development**, Bangalore/India, v. 13, p. 174-182, 2009.

ESPOSITO, D.; ANTONIETTI, M. Redefining biorefinary: the search for unconventional building blocks for materials. **Chemistry society review**, Londres, v. 44, p. 5821-5835, 2015.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X. Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: response surface methodology or using cellulose from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT – C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**, Essex/Inglaterra, v. 101, p. 4111-4119, 2010.

FILHO, P. F. S. **Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para produção de etanol celulósico e enzimas celulolíticas**. 2014. 99f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-Rn, 2014.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, Production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. **BMC biotechnology**, Londres, 2015 Doi: 10.1186/s12896-015-0129-9.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. 2001. **Past**: palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: 10 de novembro de 2016.

HERNÁNDEZ, N. et al. Culturable aerobic and facultative bacteria from the gut of the polyphagous dung beetle *Thorectes lusitanicus* Jeckel. **Insect Science**, v. 22, n. 2, 2015. Doi:10.1111/1744-7917.12094.

HUANG, S.; SHENG, P.; ZHANG, H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International journal molecular sciences**, Basel/Suíça, v. 13, n. 3, 2012. Doi: 10.3390/ijms13032563.

IUBMB, (2016), Nomenclatura das Enzimas. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 05 de maio de 2016.

KIM, S. J. et al. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 282, n. 1, p. 44-51, 2008.

KHIANNIGAM, S. et al. Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. **Journal applied pharmaceutical science**, v. 4, n. 4, p. 90-96, 2014.

KHOWALA, S.; SENGUPTA, S.. Secretion of  $\beta$ -glucosidase by *Termitomyces clypeatus*: regulation by carbon catabolite products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.144-149, 1992.

KOROIVA, R. **Enzimas e bactérias lignocelulolíticas do trato digestivo de larvas de STENOCHINORUMOS (Díptera: Chironomidae)**. 2011. 54f. Dissertação (Mestre em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

KUBICEK, C. P. et al. The trichoderma cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme microbial technology**, v.15, p. 90-99, 1993.

KULKARNY, N.; SHENDAY, A. R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS microbial review**, v. 23. p. 411-456, 1999.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). 2007. Disponível

em:<<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 6 de março de 2016.

LEE, P. Y. et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **Journal of visualized experiments**, n.62, p. 3923, 2012. DOI: 10.3791/3923

LOPES, F. et al. Thermo-Stable Xylanases from Non Conventional Yeasts. **Journal microbial & biochemical technology**, v.3, n. 3, p. 36-42, 2011.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. 2003. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Rev. **Environ. Science Biotechnology**, 1: 105-114.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in chemistry series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington/US, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do; MELO, D. C. de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, Viçosa/MG, v. 29, n. 3, p.461-470, jun. 2005. DOI: 10.1021/ac60147a030

MURAD, H. A.; AZZAZ, H. H. Cellulase and dairy animal feeding. **Biotechnology**, Frankfurt/Alemanha, v. 9, n. 3, 238-256, 2010. Doi: 10.3923/biotech.2010.238.256

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M., Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

MUYZER, G.; DE WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16 rRNA. **Applied an environmental microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de microbiologia**, São Paulo/SP, v. 27, p. 7-9, 1996.

PACE, N. R.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, v.9, n. 45, 325-326, may 1986.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. 2. ed. New York: Academic Press, 1996.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A.; MELO, L. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. Disponível em: <<http://www.ladebio.org.br/producao-cientifica/livros/>> Acesso em: 04 de maio de 2016.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 7-56.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 261 – 287.

PITTMAN, G. W. et al. Assessment of gut bacteria for a paratransgenic approach to control *Dermolepida albohirtum* larvae. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 13, p. 4036-4043, jul. 2008. doi: 10.1128/AEM.02609-07.

RAMACHANDRA, M. L.; CRAWFORD, D. L.; POMETO A. L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by streptomyces sp. a comparative study wild-type and genetically manipulated strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2754-2760, 1987.

REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 56, n. 1, p. 127-140, 1965.

REIS JÚNIOR, F. B. dos et al. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, dez. 2002. 33 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51).

SANTIAGO, L. B. et al. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá, PR. **Anais...** Maringá. 2009.

SANTOS, T. C. et al. Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas, **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Mossoró/RN, v. 7, n. 2, p. 270-276, 2012.

SAID, S.; PIETRO, R. 2002. **Enzimas de interesse industriais e biotecnológico**. Ed Eventos, Rio de Janeiro. p. 121.

SAJITH, S. et al. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of nutrition and food science**, v. 6, n. 1, p. 461, 2016. doi:10.4172/2155-9600.1000461

SCHLOSS, P.D. et al. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). **Environmental entomology**, v. 35, n. 3, p. 625-629, 2006. doi: 10.1603/0046-225X-35.3.625.

SETTE L, D.; OLIVEIRA, V. M. de; RODRIGUES M. F. A. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. **Microbiology Australia**, v. 29, n. 1, p. 18-20, 2008.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHAO Yongqi et al. In vivo Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **Plos one**, v. 9, n. 1, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0085948.

SHARMA, V. K.; CARLSON, S. A. Simultaneous detection of Salmonella strains and Escherichia coli O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment-broth culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 5472-5476, 2000.

SILVA, C. H. D. **Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 3-16, 2003.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, 4820-4835, 2010.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases production, applications and challenges. **Journal of scientific and industrial research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

SUN, J. Z.; SCHARF, M. E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Insect Science**, v. 17, p. 163-165, 2010.

TANAKA, H. et al. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shikari. **Applied microbiology biotechnology**, v. 71, p. 907-917, 2006.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied environmental microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

TEXEIRA, A. B. Manual da aula prática de eletroforese para DNA. Botucatu-SP. 2013. Disponível em <<http://br.geocities.com/andbt/biofisica/Manual.PDF>> Acessado em: 03 Abr. 2016.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.

VIERSTRAETE, A. (1999). Disponível em: <http://users.ugent.be/~avierstr/> Acesso em: 18 de maio de 2016.

XIAO, Z.; STORMS, R.; ISANG, A. Microplate – based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

WACKETT, L. P. Microbial consortia. **Environmental microbiology reports**, v. 5, p. 186-187, 2013.

WALKER, M.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. Trad.: Fernando Salvador Moreneo. São Paulo: Editora Ateneu, 1999.

WANG, C. Y. et al. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. **Enzyme and microbial technology**, v. 44, p. 373-379, 2009.

WATANABE H, TOKUDA G. Cellulolytic systems in insects. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 609-632, 2010. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085319.

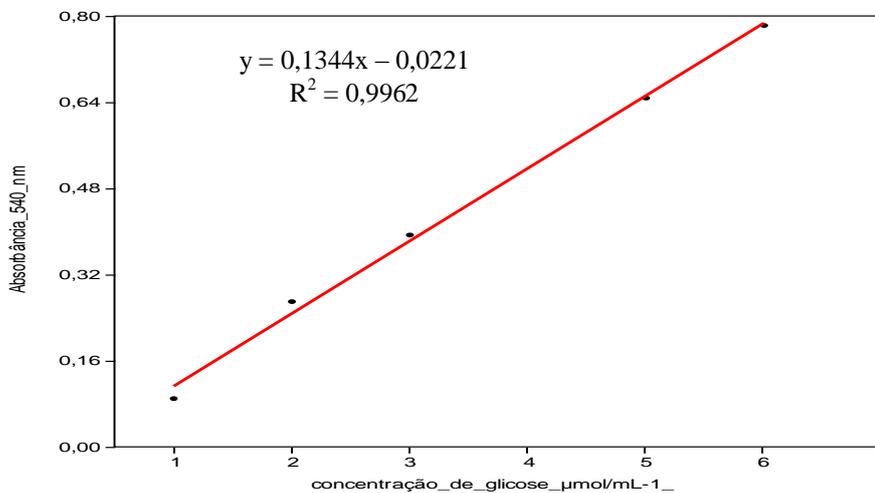
WULFF, N.A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S.F. Expression and Purification of Cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 53, 198-203, 2006.

**APÊNDICE**

## Apêndice A: Curva padrão de Glicose

As atividades enzimáticas endocelulolítica foram avaliadas, segundo metodologia proposta por Miller (1959), que possibilita a quantificação do teor de açúcares redutores liberados na reação enzimática pelo método do DNS (Ácido Dinitrosalicílico). Validados conforme curva padrão de glicose realizada utilizando espectrofotômetro, representada na Figura 20, utilizada na quantificação atividade enzimática.

**Figura 20 - Curva padrão de glicose proposta por Miller, 1959. Utilizada para quantificar atividade enzimática.**



Fonte: Dados do Autor, 2016.

A atividade enzimática foi determinada comparando as concentrações conhecida da solução de glicose da solução padrão com a solução de concentração desconhecida formada. A equação da reta foi formulada por regressão da absorbância pela concentração, formando uma equação linear, de acordo com a lei de Beer.

A concentração de glicose excretada pelas enzimas dada pela absorbância a 540nm, foi convertida em  $\mu\text{mol/mL}^{-1}$  para quantificar a atividade enzimática.