



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MAURÍCIO MARCELINO DE SOUSA ALVES

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS ISOLADAS DA
CASCA DO COCO-VERDE (*COCOS NUCIFERA*) EM FERMENTAÇÃO**

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

MAURÍCIO MARCELINO DE SOUSA ALVES

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS ISOLADAS DA
CASCA DO COCO-VERDE (*COCOS NUCIFERA*) EM FERMENTAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Coorientador: Dr. Alessandro Riffel

Maceió

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

A474p Alves, Maurício Marcelino de Sousa.
Potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas da casca do
coco-verde (*Cocos nucifera*) em fermentação / Maurício Marcelino de Sousa
Alves. – 2017.
156 f. : il.

Orientador: Antonio Euzébio Goulart Santana.

Coorientador: Alessandro Riffel.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 125-148.

Apêndices: f. 149-156.

1. Compostos orgânicos voláteis. 2. Enzimas. 3. Potencial biotecnológico -
Microorganismos. 4. Leveduras. 5. Bactérias. 6. Casca do coco verde –
Fermentação. I. Título.

CDU: 54.06 : 634.616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



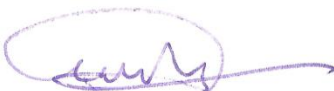
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **MAURÍCIO MARCELINO DE SOUSA ALVES**, intitulada: “**Isolamento, caracterização, produção voláteis e potencial biotecnológico de bactérias e leveduras responsáveis pela fermentação da casca do coco-verde**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 11 de maio de 2017, às 08h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar da Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
(Orientador – PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Iraildes Pereira Assunção
(CECA/UFAL)


Prof. Dr. Edson de Souza Bento
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Janaina Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)

A meus pais, irmãos, familiares e amigos...

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro,

Ao professor Euzébio e Alessandro pelos conselhos e orientação,

Ao Henrique, Karlos, Kelly, Isis, Chrys e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho,

Aos meus pais, Maria da Conceição de Sousa e Maurício Marcelino Alves por tudo que me proporcionaram,

Aos meus amigos, em especial, Lucas, por me ter ajudado em alguns momentos de dificuldade,

A Deus, por todas as oportunidades dadas.

Meus sinceros agradecimentos!

Obrigado!

RESUMO

A cultura do coqueiro é economicamente importante para o Brasil, mas sofre com a proliferação de pragas que almejam os coqueiros e causam prejuízo econômico. Uma das pragas é a broca-do-olho-do-coqueiro, *R. palmarum* L., que é atraído para os locais de infestação pelo odor de fermentação de tecidos vegetais. Isto é particularmente problemático quando os locais de plantação, de processamento dos frutos e de descarte de resíduos são próximos, pois o resíduo gerado (casca do coco-verde, por exemplo) sofre ação de microrganismos que produzem compostos voláteis e atraem o inseto para a plantação. Esta pesquisa teve como objetivo o isolamento e a caracterização de bactérias e leveduras responsáveis pela fermentação da casca do coco-verde com concomitante produção de compostos voláteis atrativos para a broca-do-olho-do-coqueiro. Para tanto, cascas de coco-verde recém-abertas foram expostas ao ambiente para desenvolvimento de processo fermentativo, sendo a emissão de voláteis analisada em cinco dias diferentes de fermentação (dias 0, 3, 5, 7 e 10). Trinta compostos de classes químicas variadas foram detectados para os diferentes dias de fermentação, sendo encontrados álcoois, cetonas, aldeídos e hidrocarbonetos com maior frequência. Isolamentos foram realizados após abertura dos cocos e no sexto dia de fermentação. Após purificação, trinta e oito linhagens (15 bactérias e 23 leveduras) foram obtidas e caracterizadas. A caracterização teve como base a determinação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e a avaliação do potencial biotecnológico. As linhagens isoladas exibiram perfil bioquímico variado, sendo que todos apresentaram pelo menos um resultado positivo para alguma das enzimas extracelulares testadas. Embora as bactérias tenham sido halotolerantes, as leveduras foram mais. Dentre as bactérias isoladas, o isolado A5 se destacou por apresentar atividade para todas as enzimas testadas exceto lacases, além de demonstrar capacidade de degradar papel de filtro em meio líquido. O isolado E4 se destacou entre as leveduras por apresentar atividade para cinco enzimas (amilases, pectinases, xilanases, proteases e lipases/esterases), além de apresentar tolerância a 10% de NaCl. Portanto, cada linhagem isolada apresentou potencial biotecnológico variável, algumas sendo potenciais candidatas para a produção de voláteis pela fermentação da casca do coco-verde. Alguns isolados foram identificados a nível de gênero pela técnica de MALDI-TOF, resultando na identificação de três gêneros de bactérias (*Bacillus*, *Pantoea* e *Arthrobacter*) e três de leveduras (*Pichia*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*). A produção de voláteis por culturas puras de quatro isolados selecionados foi estudada, sendo encontrados mais de 100 compostos diferentes, principalmente cetonas, ácidos carboxílicos, pirazinas, ésteres, hidrocarbonetos, aldeídos, terpenos e terpenóides. Alguns dos voláteis detectados já haviam sido relatados como atrativos para o *R. palmarum*., confirmando que existe relação entre a atividade metabólica dos microrganismos isolados e produção de voláteis atrativos para esta praga.

Palavras-chave: Potencial Biotecnológico. Compostos Orgânicos Voláteis. Bactérias. Leveduras. Casca do coco-verde. Enzimas.

ABSTRACT

The culture of coconut is economically relevant to Brazil but suffers with the breeding of pests that target coconut trees and bring on economic losses. One of the pests responsible for such is the palm weevil *R. palmarum* L., which is attracted to the infestation site by the odor released from the fermentation of plant tissues. This is particularly problematic when the crop, processing and disposal sites are in close location, for the residue discarded (i.e. green coconut shell) undergoes the action of microorganisms that produce volatile compounds and attract the pest to the crop site. This research had as its objective the isolation and characterization of bacteria and yeasts responsible for the fermentation of green coconut shell and production of volatile compounds that are attractive to the palm weevil. For such, green coconut shells were exposed to the local environment for the development of the fermentative processes, having the emitted volatiles analyzed on five different days of fermentation (0, 3, 5, 7, and 10 days). Thirty different compounds belonging to different chemical classes were detected for all of the analyzed days, being alcohols, ketones, aldehydes and hydrocarbons the most frequently found. Isolation procedures were performed immediately after the opening of the coconuts and at the sixth day of fermentation. After purification, thirty eight strains (15 bacteria and 23 yeasts) were obtained and characterized. The characterization of the strains was based on the determination of morphological, physiological and biochemical characteristics and the evaluation of the biotechnological potential. The isolated strains presented variable biochemical profile, although each of them displayed at least one positive result for the tested enzymes. Although bacterial isolates were halotolerant, yeast strains were more. Among the bacterial strains, the isolate A5 stood out for displaying activity for all of the tested enzymes except for laccase besides being capable of degrading filter paper in liquid media. The isolate E4 stood out among the yeast strains for presenting activity for five of the tested enzymes (amylases, pectinases, xylanases, proteases and lipases/esterases) besides displaying tolerance up to 10% NaCl. Therefore each strain presented different biotechnological potential, some of them being potential candidates for the production of volatile compounds by fermentation of the green coconut shell. A few strains were identified to the genus level by the technique of MILDIT-TOF, resulting in identification of three bacterial (*Bacillus*, *Pantoea* e *Arthrobacter*) e three yeasts (*Pichia*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*) genera. The production of volatile compound by four selected strains was investigated and resulted on the detection of over 100 different compounds, among which are included ketones, carboxylic acids, pyrazines, esters, hydrocarbons, aldehydes, terpenes and terpenoids. A few of the detected volatiles had been previously reported as attractive to *R. palmarum* confirming that there is a relationship between the metabolic activity of the isolated microorganisms and production of volatiles attractive to this pest.

Keywords: Biotechnological potential. Volatile Organic Compounds. Bacteria. Yeasts. Green coconut shell. Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das regiões de estruturas amorfas e cristalinas encontradas nas microfibrilas nativas de celulose e das ligações de hidrogênio intra (seta vermelha) e intermoleculares (seta verde) entre as cadeias de celulose.....	19
Figura 2 - Estruturas químicas comumente encontradas em diferentes tipos de hemiceluloses e sítios de ação (setas) de algumas hemicelulases.....	21
Figura 3 - Modelo estrutural de lignina.....	24
Figura 4 - Esquema da estratégia utilizada na execução deste trabalho.....	38
Figura 5 - Sistema de aeração utilizado para coleta dos voláteis emitidos durante fermentação das cascas de coco-verde. O procedimento foi realizado durante quatro horas à temperatura ambiente e nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 do processo de fermentação.....	40
Figura 6 - Aspecto das cascas de coco-verde nos dias 4 e 6 do processo fermentativo.....	43
Figura 7 - Cromatogramas obtidos para as análise dos voláteis coletados por aeração durante o período de fermentação das cascas de coco-verde nos dias 3 (A), 5 (B), 7(C) e 10 (D). As letras de a-z e A-D referem-se aos compostos tentativamente identificados listados na Tabela 1.....	54
Figura 8 - Placas de Petri com os cinco meios diferentes de isolamento após 12 dias de incubação a $32 \pm 2^\circ\text{C}$	60
Figura 9 - Características morfológicas das colônias das bactérias A2, A5 e D2 e das leveduras C1, A7 e E10 crescidas em meio NYDA modificado durante 48h.....	63
Figura 10 - Morfologia celular de alguns isolados representativos. A5, B7, B9 e D1 são bactérias, enquanto que C5 e A7 são leveduras. Magnificação de 1600x.....	64
Figura 11 - Efeito do aumento da concentração de NaCl no crescimento dos isolados após sete dias de incubação a $32 \pm 2^\circ\text{C}$	66
Figura 12 - Atividade de enzimática dos isolados A5 e E12. A: avicelase, B: carboximetilcelulase, C: tirosinase, D: xilanase e E: polifenoloxidasas. As setas indicam a zona de atividade.....	73
Figura 13 - Atividade de enzimática dos isolados A5, A7 e B10. A: amilase, B: pectinase, C: protease, D: lipase/esterase e E: DNase. As setas indicam o halo de atividade.....	79
Figura 14 - Crescimento dos isolados A3, A5, A7 e B9 e controle negativo em meio de cultura líquido (meio 1) com papel de filtro como fonte principal de carbono e energia aos 10 dias de incubação.....	87
Figura 15 - Crescimento dos isolados A3, A5, A7 e B9 e controle negativo em meio de cultura líquido (meio 2) com papel de filtro como fonte de carbono e energia aos 10 dias de incubação.....	87
Figura 16 - Degradação de papel de filtro por ação da bactéria A5 após 50 dias de incubação em meio semissintético (A) e meio sintético (B). 89	
Figura 17 - Crescimento e atividade descolorante das bactérias A5, B7 e D1 e das leveduras A7 e E12 em meio sólido contendo os corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala observados no 5º dia de incubação.....	90

Figura 18 - Índices de descoloração de vermelho congo e rosa bengala após 12 dias de incubação.....	91
Figura 19 - Descoloração dos corantes vermelho congo, rosa bengala e azul de metileno após 24 (A e C) e 72h (B e D) de incubação a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com os isolados A5, B6, B7, B8, C2, D4 e E11 em meio de cultura líquido complexo (A e B) e sintético (C e D).....	93
Figura 20 - Sobrenadante livre de células das culturas dos testes de descoloração observados após 72h de incubação a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em meio líquido sintético (A, C e E) e complexo (B, D, e F) na presença de azul de metileno (A e B), rosa bengala (C e D) e vermelho congo (E e F). C-: controle negativo.....	94
Figura 21 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado A5 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C . Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados em concentração pelo menos duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril)	104
Figura 22 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado D1 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C . Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou com concentração pelo menos duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).....	105
Figura 23 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado D5 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C . Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados numa concentração duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).....	113
Figura 24 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pela levedura E4 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C . Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados numa concentração duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).....	114
Figura 25 - Compilação dos cromatogramas dos controles negativos (meio NYDAm estéril) obtidos para análises realizadas em momentos diferentes.....	117
Figura 26 - Estruturas de alguns compostos tentativamente identificados no headspace de culturas das bactérias A5 e D1, das leveduras D5 e E4 e do controle negativo (meio NYDAm estéril).....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Compostos tentativamente identificados por CG-EM e seus respectivos IRL calculados.....	55
Tabela 2-	Relação descrita na literatura entre espécies de microrganismos e os voláteis emitidos pelo processo de fermentação da casca de coco-verde.....	56
Tabela 3-	Isolados obtidos relacionados por meio de cultura e matriz de isolamento.....	61
Tabela 4-	Características morfológicas dos isolados crescidos em meio NYDA modificado.....	62
Tabela 5-	Crescimento dos isolados em meio com diferentes concentrações de NaCl (5%, 10% e 15% m/v).....	65
Tabela 6-	Produção de ácidos a partir da fermentação de diversos compostos, crescimento em meio MSA e hidrólise de tirosina.....	68
Tabela 7-	Capacidade de degradação de celulose, xilano de madeira de faia, oxidação de guaiacol, de ácido gálico e de tirosina das bactérias e de leveduras isoladas da casca do coco-verde em fermentação.....	71
Tabela 8-	Produção de amilases, pectinases, proteases, lipases/esterases e DNAses das bactérias e leveduras isoladas neste trabalho.....	78
Tabela 9-	Potencial biotecnológico das bactérias isoladas.....	98
Tabela 10-	Potencial biotecnológico das leveduras isoladas.....	100
Tabela 11-	Compostos tentativamente identificados por CG-EM do <i>headspace</i> de culturas das bactérias A5 e D1 em 2, 7 e 14 dias de incubação.....	106
Tabela 12-	Compostos tentativamente identificados por CG-EM do <i>headspace</i> das culturas das leveduras D5 e E4 em 2, 7 e 14 dias de incubação a 32 °C.....	115
Tabela 13-	- Compostos encontrados no controle para os respectivos dias de teste dos tratamentos com os isolados A5, D1, D5 e E4.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
B.O.D.	Incubadora para demanda biológica de oxigênio
CA	Coco-Ágar
CG	Cromatografia Gasosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Comisson Number (sistema de nomenclatura de enzimas baseado na reação catalisada)
EM	Espectrometria de Massas
HS	<i>Headspace</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice Enzimático
IRL	Índice de Retenção Linear
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz- Tempo de Voo
MSA	Manitol-Sal-Agar
NYDA _m	Nutrient-Yeast-Dextrose-Ágar modificado
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	Politetrafluoretileno
RBA	Rosa bengala-Ágar
SPME	Microextração em fase sólida
TIC	Corrente Iônica Total
TR	Tempo de Retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A Cultura do Coqueiro e a Casca do Coco-verde	15
2.2	Microrganismos, Aleloquímicos e Compostos Voláteis	16
2.3	Enzimas, Microrganismos e Biotecnologia	18
2.3.1	Celulases.....	19
2.3.2	Hemicelulases.....	21
2.3.3	Ligninas e enzimas lignolíticas.....	23
2.3.3.1	Lacases.....	24
2.3.3.2	Tirosinases.....	27
2.3.4	Proteases.....	28
2.3.5	Esterases e lipases.....	30
2.3.6	Amilases.....	32
2.3.7	Pectinases.....	33
2.3.8	DNAses.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Estratégia Geral Adotada	38
4.2	Reagentes e Equipamentos Utilizados	38
4.3	Extração e Análise de Compostos Orgânicos Voláteis	39
4.3.1	Extração dos voláteis emitidos pelo processo de fermentação da casca do coco-verde.....	39
4.3.2	Extração dos voláteis emitidos por culturas puras de linhagens dos microrganismos isolados por microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (HS-SPME)	40
4.3.3	Análise dos voláteis obtidos por CG-EM.....	41
4.3.4	Seleção dos compostos voláteis representativos.....	42
4.4	Processo de Fermentação das Cascas de Coco-verde, Isolamento, Purificação e Manutenção das Bactérias e Leveduras em Laboratório	42
4.5	Caracterização Bioquímica, Fisiológica e Morfológica	44
4.5.1	Morfologia das colônias.....	44
4.5.2	Coloração de Gram	44
4.5.3	Produção de catalase.....	44
4.5.4	Produção de ácido a partir carboidratos e outros substratos.....	45
4.5.5	Crescimento em meio manitol-sal-ágar (MSA).....	45
4.5.6	Halotolerância.....	45
4.5.7	Hidrólise de L-tirosina.....	45
4.6	Potencial Biotecnológico dos Isolados	46
4.6.1	Avicelases.....	46
4.6.2	Carboximetilcelulases.....	47
4.6.3	Xilanases.....	47
4.6.4	Pectinases.....	47
4.6.5	Amilases.....	47
4.6.6	Proteases.....	48
4.6.7	Lacases.....	48

4.6.8	Polifenoloxidasas.....	48
4.6.9	Tirosinases.....	49
4.6.10	Lipases/esterases.....	49
4.6.11	DNAses.....	49
4.6.12	Capacidade de crescimento e degradação de papel de filtro.....	49
4.6.12.1	Teste 1 para degradação de papel de filtro.....	50
4.6.12.2	Teste 2 para degradação de papel de filtro.....	50
4.6.13	Descoloração dos corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala.....	50
4.6.13.1	Descoloração em meio sólido.....	50
4.6.13.2	Descoloração em meio líquido.....	51
4.7	Identificação dos Isolados por MALDI-TOF.....	51
4.8	Análises Estatísticas.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1	Voláteis Emitidos pelas Cascas de Coco-verde em Fermentação.....	53
5.2	Isolamento e Purificação dos Microrganismos.....	59
5.3	Caracterização dos Microrganismos Isolados.....	62
5.3.1	Morfologia das colônias e morfologia celular.....	62
5.3.2	Características bioquímicas e fisiológicas dos isolados.....	64
5.3.3	Produção de ácido a partir de carboidratos e outros compostos.....	68
5.3.4	Produção de catalase.....	70
5.4	Potencial Biotecnológico dos Isolados.....	71
5.4.1	Produção de celulases, xilanases, lacases, tirosinases e polifenoloxidasas.....	71
5.4.2	Produção de amilases, pectinases, proteases, lipases/esterases e DNAses.....	78
5.4.3	Degradação de papel de filtro.....	86
5.4.3.1	Teste 1.....	86
5.4.3.2	Teste 2.....	88
5.4.4	Descoloração dos corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala.....	89
5.4.4.1	Meio sólido.....	89
5.4.4.1.1	Vermelho congo.....	90
5.4.4.1.2	Azul de metileno.....	90
5.4.4.1.3	Rosa bengala.....	91
5.4.4.2	Meio líquido.....	92
5.4.4.2.1	Vermelho congo.....	94
5.4.4.2.2	Rosa bengala.....	95
5.4.4.2.3	Azul de metileno.....	97
5.5	Análise do Potencial Biotecnológico dos Isolados.....	98
5.6	Identificação dos Isolados por MALDI-TOF.....	102
5.7	Voláteis Produzidos por Culturas Puras.....	102
6	CONCLUSÃO.....	123
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	124
	REFERÊNCIAS.....	125
	APÊNDICE.....	149

1 INTRODUÇÃO

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*) possui grande importância econômica para o Brasil, tendo gerado mais de três milhões de empregos diretos e indiretos até 2013 (CUENCA, 2016). Comercialmente, tanto o coco-verde quanto o coco-seco podem ser usados como matéria prima para a obtenção de diversos materiais. O coco-seco é usado principalmente para a produção de óleo e extração de albúmen sólido (polpa), sendo a casca, resíduo dos processos de extração, aproveitada para outros fins (FONTENELE, 2005). Quando o coco-verde é utilizado como matéria prima para a extração de albúmen líquido (água-de-coco), o resíduo gerado (casca de coco-verde) é descartado, sendo encaminhado a aterros sanitários ou lixões (ROSA et al., 2001; MATTOS et al., 2013).

Ao acumularem no ambiente, as cascas de coco-verde sofrem ação de microrganismos que fermentam o tecido vegetal e produzem compostos voláteis atrativos para diversos insetos, incluindo a praga do coqueiro conhecida como broca-do-olho-do-coqueiro (*Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae)), tornando o local um potencial criadouro de insetos. A atração de insetos-praga por resíduos é problemática caso o sítio de descarte de resíduos seja próximo ao de cultivo dos coqueiros, pois os insetos podem ser atraídos para a plantação (DUARTE, 2015).

Os compostos utilizados na comunicação entre organismos de espécies diferentes, como observado pela atração que o *R. palmarum* sofre pelas cascas de coco-verde em fermentação, são chamados aleloquímicos (RAJCHARD, 2013).

A produção de compostos voláteis por microrganismos, bem como suas atividades biológicas em animais, plantas e microrganismos, vêm sendo investigadas por diversos pesquisadores, tanto para bactérias como para fungos (filamentosos e leveduriformes) (ARGUELLO et al., 2013; KANCHISWAMY; MALVOY; MAFFEI, 2015). Compostos voláteis são bons candidatos a aleloquímicos, pois podem se difundir a grandes distâncias através de diferentes matrizes, tais como ar, solo e líquidos (AUDRAIN et al., 2015).

Microrganismos são utilizados para a produção de enzimas com aplicação em diversos setores, desde a indústria alimentícia a terapêutica e pesquisa científica. A produção em larga escala de enzimas de origem microbiana é muitas vezes preferida às de origem animal ou vegetal porque possuem maior facilidade no aumento da escala de produção, manipulação genética mais simples e propriedades

industrialmente interessantes, como termoestabilidade, halotolerância, alcalotolerância, acidotolerância, especificidade, seletividade etc. (SOARES et al., 2012).

Com base no que já foi apresentado, o objetivo deste trabalho foi a caracterização do potencial biotecnológico das bactérias e leveduras responsáveis pelo processo de fermentação da casca de coco-verde e emissão de voláteis atrativos ao *R. palmarum*. O trabalho em si é inovador porque propõe o isolamento de microrganismos da casca do coco-verde em fermentação, resíduo vegetal atrativo ao *R. palmarum*, uma praga de interesse econômico, e estudo da interação entre os microrganismos isolados e esta praga por meio da produção de voláteis por culturas puras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Cultura do Coqueiro e a Casca do Coco-verde

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*) no Brasil tornou-se economicamente importante a partir dos anos de 1990, passando de uma cultura majoritariamente de subsistência e sem insumos, para uma voltada ao mercado e de escala industrial, recebendo contribuições de ciência, tecnologia e capital (CAVALCANTE, 2015). Tal mudança de estruturação foi acompanhada pelo aumento de área plantada e quantidade de frutos produzida, passando de 213.908 hectares com 734.418 frutos colhidos em 1990 para 251.665 e 1.958.663, respectivamente, em 2015 (IBGE, 2015).

De acordo com Cuenca (2016), um hectare de coqueiros plantados gera em média 3 empregos diretos e 12 indiretos. Tomando como base a área plantada em 2015, cerca de 760 mil empregos diretos e 3 milhões de indiretos foram gerados durante a cadeia produtiva do coco no Brasil.

Tanto o coco-verde como o coco-seco podem ser aproveitados como matéria prima para diversos produtos. Do coco-seco podem ser aproveitados o albúmen sólido (como coco ralado, para a extração de leite de coco, fabricação de bebidas, margarinas, entre outros), o endocarpo (artesanato, combustível calorífico, matéria prima para fabricação de carvão ativado etc.) e o mesocarpo (fibras usadas na fabricação de tapetes, mantas, colchões, entre outros) (FONTENELE, 2005).

Do coco-verde podem ser aproveitados o albúmen líquido ou água-de-coco (bebida isotônica, reidratante, anti-helmíntica e tenicida, meio de cultura natural, entre outros) e o mesocarpo (obtenção de pó para fins agrícolas, confecção de vasos e placas para jardinagem, entre outros) (FONTENELE, 2005). Um exemplo de aplicação envolvendo a casca do coco-verde é sua utilização como biossorvente para a remoção de metais tóxicos (PINO et al., 2006; SOUSA et al., 2010). Sousa et al. (2010) investigaram a capacidade de absorção de íons (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+}) do pó da casca do coco-verde pré tratado com NaOH 0,1M em coluna de leito fixo e observaram remoção destes íons de soluções aquosas do íons individuais bem como de uma mistura, além de remoção eficiente de Ni^{2+} (2,787 mg/L), Zn^{2+} (98,02 mg/L) e Cu^{2+} (320,4 mg/L) de uma amostra de efluente de uma indústria de galvanoplastia contanto que o pH fosse ajustado para 5,0.

O coco-verde é industrialmente utilizado para a extração da água-de-coco e gera como resíduo a casca do coco-verde, que compõe cerca de 80% da massa do fruto. Devido a propriedades da casca do coco-verde, tais como alta umidade (85%) e certas características da fibra, as aplicações geralmente destinadas às fibras da casca do coco-seco são inviáveis para as do coco-verde. Como são produzidas em altas quantidades (toneladas/dia), não existem muitas tecnologias de reaproveitamento que façam uso de todo o resíduo gerado. Deste modo, as cascas são normalmente descartadas e enviadas a aterros sanitários ou lixões, o que causa problemas como a emissão de metano (gás do efeito estufa), mau cheiro, foco para vetores transmissores de doenças, contaminação do solo e corpos d'água, entre outros (ROSA et al., 2001; MATTOS et al., 2013).

2.2 Microrganismos, Aleloquímicos e Compostos Voláteis

Diversos estudos relatam que compostos voláteis emitidos pela fermentação da seiva e de tecidos vegetais (toletes de cana-de-açúcar, casca de coco-verde, resíduo de pupunha, entre outros) atuam como atrativos para uma das principais pragas do coqueiro, chamada broca-do-olho-do-coqueiro, *R. palmarum*, inseto considerado a principal responsável pela disseminação de doenças letais, especialmente como vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, causador do anel vermelho, em diversas culturas de importância econômica, como coqueiro, dendê (*Elaeis guineensis*), açaí (*Euterpe oleracea*) e pupunha (*Bactris gasipaes*) (MOURA et al., 1997; SOLIMAN et al., 2010; FERREIRA et al., 2014; SILVA, C. et al., 2016).

Duarte (2015) investigou o efeito da fermentação de cascas de coco-verde na atração do *R. palmarum* e constatou que existem voláteis liberados que são atrativos tanto para machos quanto para fêmeas, sendo a atratividade mais acentuada entre os dias 5 e 7 do processo fermentativo. A casca do coco-verde é composta, em sua maioria, por celulose (24 a 33 %), lignina (25 a 40 %) e hemiceluloses (12 a 29%) (GONÇALVES, F. et al., 2015; CABRAL et al., 2017), tornando altas as chances de que microrganismos celulolíticos, hemicelulolíticos e ligninolíticos estejam envolvidos no processo de produção de voláteis.

Muitos insetos, tais como o *R. palmarum* L., conseguem encontrar sua fonte de alimentos através de pistas olfativas, constituídas por moléculas dispersas em fase gasosa. Quando um composto químico é empregado na interação entre

organismos de espécies diferentes, ele é denominado aleloquímico. Este tipo de comunicação química é utilizada por microrganismos, vertebrados, invertebrados e plantas (RAJCHARD, 2013).

Os aleloquímicos podem ser subdivididos em alomônios, quando apenas o organismo emissor é beneficiado, cairomônios, quando apenas o organismo receptor é beneficiado, e sinomônios, quando ambos os organismos são beneficiados (PETROSKI et al., 2005; RAJCHARD, 2013). No caso do *R. palmarum*, os compostos atrativos liberados pela fermentação da casca do coco-verde atuam como cairomônios.

Compostos voláteis possuem baixa massa molecular (< 300 Da) e alta pressão de vapor (0,01 KPa a 20°C), sendo particularmente úteis como aleloquímicos, pois possuem a capacidade de se difundir a grandes distâncias através da atmosfera, do solo e de líquidos, o que os torna efetivos em comunicações de curta e longa distâncias (AUDRAIN et al., 2015; KANCHISWAMY; MALVOY, MAFFEI, 2015).

Num estudo realizado por Azuara-Domínguez et al. (2012) foi encontrado que os voláteis emitidos pelo fermentado da planta agave-azul (*Agave tequilana*) (acetato de etila, etanol, 2-butanol e ácido acético) potencializam a ação atrativa do feromônio de *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae).

Rochat et al. (2000) estudaram o efeito sinérgico que os voláteis liberados pela fermentação de tecidos vegetais (colmo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), coroa do coqueiro, tronco de Jacaratiá-do-tronco-grosso (*Jacaratia digitata*) e seiva do dendezeiro) possuem em relação à ação do feromônio rincoforol na atração da broca-do-olho-do-coqueiro *R. palmarum* L. e elaboraram duas formulações sintéticas (contendo acetoina, 2,3-butanodiol, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-feniletanol) com cerca de 75% da eficiência das iscas usadas naturalmente (fragmentos de cana-de-açúcar fermentados). De acordo com os autores, os compostos citados são característicos dos liberados pela fermentação do coqueiro.

Uma variedade de voláteis biologicamente ativos são produzidos por bactérias e leveduras, muitos dos quais possuem aplicações práticas para o ser humano. Tais compostos pertencem a diferentes classes química, sendo encontrados álcoois, terpenos e terpenóides, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos aromáticos, nitrogenados, sulfurados, entre

outros (SUÁREZ et al., 2007; MAURIELLO et al., 2009; AUDRAIN et al., 2015; KANCHISWAMY; MALVOY; MAFFEI, 2015).

Diversas espécies de bactérias e leveduras foram descritas como produtoras de compostos atrativos a insetos. Por exemplo, 3-metil-1-butanol, produzido por várias espécies de bactérias (*Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*), atua como atrativo para a mosca-das-frutas *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) (LEROY et al., 2011). Este mesmo composto foi detectado, junto ao 2-feniletanol e a acetoina, numa combinação de voláteis produzida por algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta mistura é ativa nos sensores olfativos da mosca *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) e foi apontada como possível sinal químico para atração da mosca para sítios colonizados por *S. cerevisiae* (ARGUELLO et al., 2013).

Scheidler et al.(2015) realizaram um estudo envolvendo a interação química de *D. melanogaster* e *D. suzukii* e seis espécies de leveduras (*Pichia terricola*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida californica*, *Candida zemplinina* e *S. cerevisiae*) normalmente associadas a estas espécies. Estes pesquisadores relataram que ambas as espécies de moscas conseguem diferenciar as espécies de leveduras com base no perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos. Dentre estes, acetato de isobutila, acetato de isoamila e hexanoato de etila aparentam estar envolvidos nesta diferenciação.

2.3 Enzimas, Microrganismos e Biotecnologia

De acordo com Adrio e Demain (2014), mais de 500 processos industriais fazem uso de enzimas, sendo cerca 30% utilizados como biocatalisadores. Muitos destes fazem uso de condições específicas de operação, como altas temperaturas e presença de solventes orgânicos, nas quais muitas enzimas são inativas. Portanto, muitos dos procedimentos utilizados se beneficiam com a descoberta de enzimas com propriedades distintas, como a capacidade de atuar em valores extremos de pH, em altas temperaturas, em soluções com elevadas pressões osmóticas ou na presença de solventes orgânicos, bem como estereosseletividade e alta especificidade (KAR; RAY, 2011; KUHAD et al., 2016).

A utilização de enzimas de origem microbiana possuem diversas vantagens com relação às de origem vegetal e animal, pois as culturas se desenvolvem rapidamente e podem ser produzidas em larga escala em fermentadores industriais

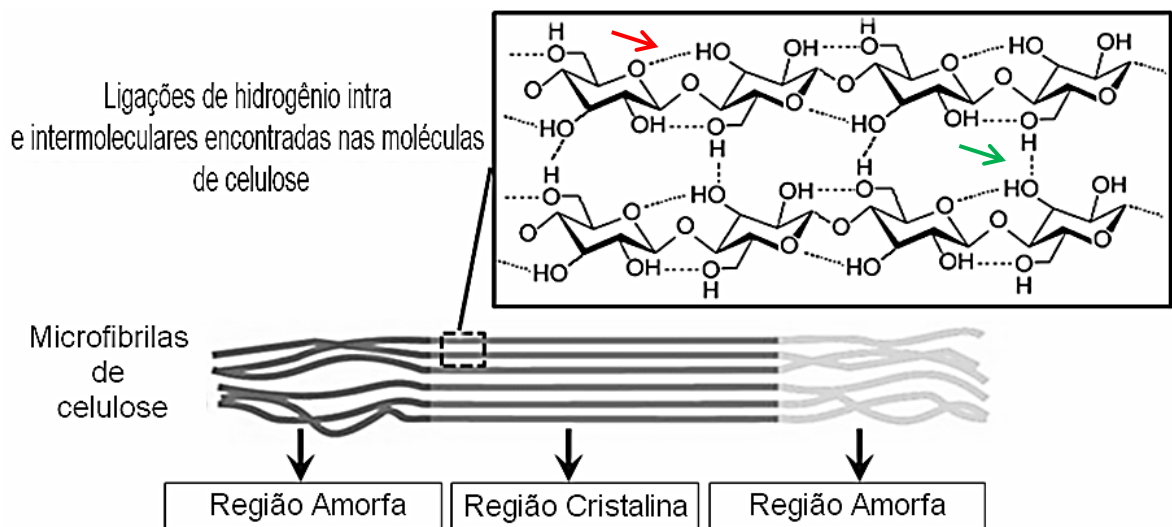
através de métodos não dispendiosos, possuem menor custo de produção, há maior facilidade de manipulação genética, a produção não é afetada por efeitos de sazonalidade, e as enzimas possuem uma ampla faixa de propriedades físicas e químicas nas quais são ativas (SOARES et al., 2012).

2.3.1 Celulases

Celulose é o polímero natural mais abundante no planeta terra. Ocorre principalmente em plantas, mas pode ser sintetizada por poucos animais e bactérias (LYND et al., 2002). É um polímero formado por monômeros de glicose conectados por ligações glicosídicas β -1,4 (COX; NELSON, 2011).

A celulose ocorre como microfibras de arranjo cristalino, estabilizado por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, possuindo zonas de estrutura amorfa (Figura 1). Além disso, a estrutura cristalina torna as fibras de celulose pouco solúveis em água. É geralmente encontrada em associação com outros biopolímeros, como hemicelulose e lignina, o que confere resistência ao ataque enzimático e diminui a velocidade e extensão da reação de hidrólise (LYND et al., 2002).

Figura 1 – Esquema das regiões de estruturas amorfas e cristalinas encontradas nas microfibrilas nativas de celulose e das ligações de hidrogênio intra (seta vermelha) e intermoleculares (seta verde) entre as cadeias de celulose.



Fonte: adaptado de Zhou e Wu (2002).

O sistema celulolítico é responsável pela degradação enzimática da celulose. É composto por três conjuntos de enzimas: as exoglucanases (EC 3.2.1.91), que agem a partir dos terminais redutores e não redutores das cadeias de celulose,

produzem glicose ou celobiose e atacam celulose microcristalina através de remoção de cadeias de celulose da estrutura microcristalina; as endoglucanases (EC 3.2.1.4), que agem nos sítios amorfos das cadeias de celulose gerando glicose e celooligossacarídeos, sendo as responsáveis pela hidrólise de carboximetilcelulose; e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que produzem glicose pela hidrólise de celobiose e celodextrinas (KARMAKAR; RAY, 2011).

Celulases possuem aplicações em diversas áreas. Podem ser usadas para sacarificação de material celulósico (SUKUMARAN et al., 2009; BUDIHAL; AGSAR; PATIL, 2016), possibilitando sua conversão em produtos de maior valor agregado, como etanol (GUPTA et al., 2012), ácidos orgânicos (HU et al., 2015; GUPTA, A. et al., 2015) etc.. São utilizadas pra auxiliar no processo de extração de suco de frutas e de óleos de vegetais, alterar as propriedades de tecidos feitos de celulose, como aditivo em detergentes de lavanderia, no processo de biopolpamento, como aditivo em ração animal para o aumento da digestibilidade dos grãos, entre outros (SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R., 2005; PANDEY MENENDEZ; GARCIA-FRAILE; RIVAS, 2015).

As propriedades específicas requeridas para a aplicação de celulase dependem do processo almejado, sendo a termoestabilidade (todos os processos), estabilidade em ambientes ácidos (biocombustíveis), alcalinos (tratamento de resíduos e indústria têxtil) ou hipersalinos com atividade num ampla faixa de pH (detergentes) as mais desejadas (KUHAD et al., 2016).

Uma celulase produzida por *Bacillus* sp. DNH5437 foi isolada e apresentou atividade máxima em 60°C e pH 5. A enzima se apresentou estável nas temperaturas entre 20°C e 60°C e entre pH 5 e 10, além de ser capaz de hidrolisar CMC, celulose microcristalina, celulose e pó de serra, sendo apontada como tendo potencial para aplicações industriais em razão de sua atividade com diferentes substratos, estabilidade térmica e numa ampla faixa de valores de pH (HATEFI et al., 2017).

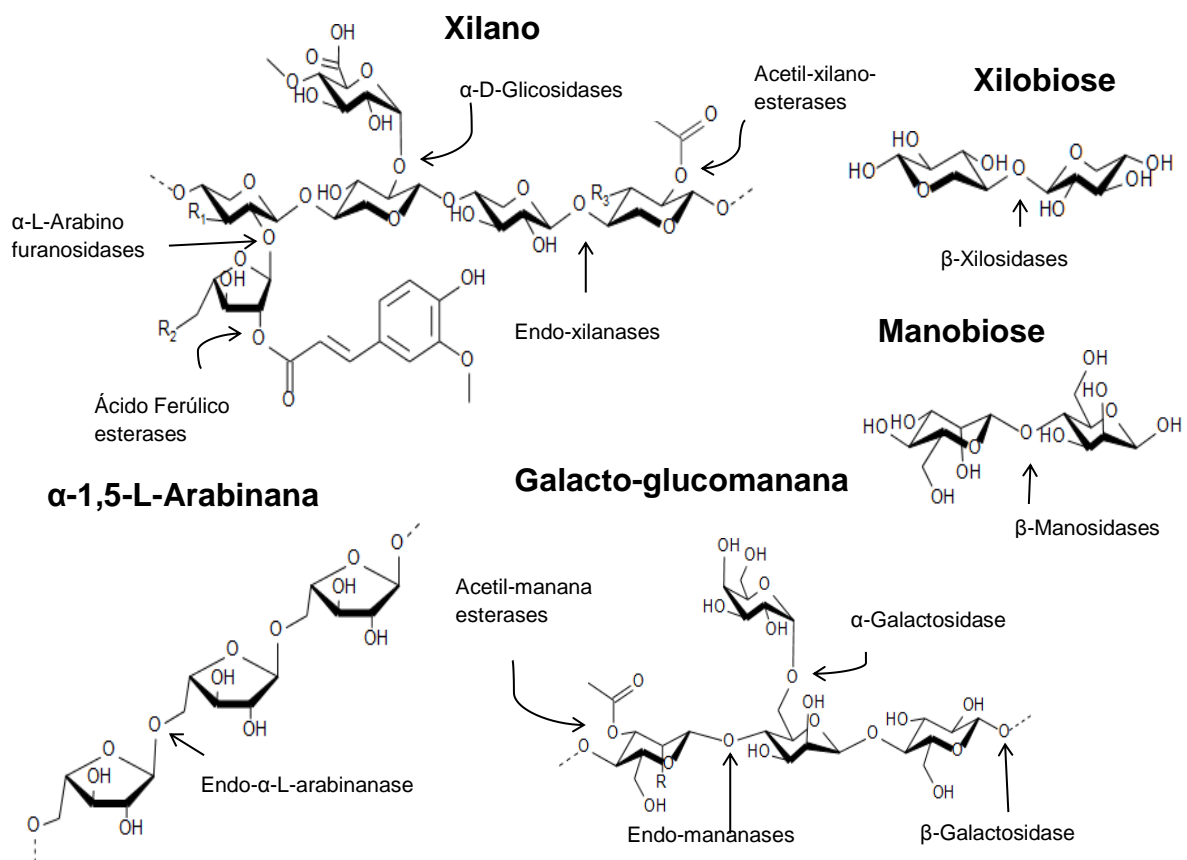
Bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Methanobrevibacter*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Caldocellulosiruptor*, *Anaerocellum*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Bacteroides* e *Acetivibrio* (SCHWARZ, 2001; LYND et al., 2002; BUDIHAL; AGSAR; PATIL, 2016), fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Cylindrocladium* (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; DEVI; KUMAR, 2012;

SUKUMARAN; SINGHANIA, PANDEY, 2005) e as leveduras *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans* (DENNIS, 1972), *Acremonium strictum* AAJ6 (GOLDBECK et al., 2012) e *Cryptococcus* spp. (THONGEKKAEW et al., 2008; DE SOUZA et al., 2013) já foram relatados como produtores de celulases.

2.3.2 Hemicelulases

As hemiceluloses formam um grupo heterogêneo de polissacarídeos encontrados intimamente associados à celulose nas paredes das células vegetais. São formados por diferentes monômeros (glicose, galactose, manose, fucose, xilose, arabinose) conectados principalmente por ligações glicídicas β -1,4, podendo ter substituintes carregados, o que as torna amorfas e solúveis em água. Dentre as hemiceluloses mais conhecidas, podem-se citar os xiloglicanos, as mananas e os xilanos (forma mais abundante de hemicelulose) (Figura 2) (PAULY et al., 2013).

Figura 2 – Estruturas químicas comumente encontradas em diferentes tipos de hemiceluloses e sítios de ação (setas) de algumas hemicelulases.



Fonte: adaptado de Shallon e Shoham (2003).

As hemicelulases são as enzimas responsáveis pela degradação das hemiceluloses. A natureza variável da organização e composição das hemiceluloses exige a ação coordenada de enzimas com atividades distintas para sua completa degradação. As hemicelulases possuem atividade de glicídio hidrolases, que hidrolisam as ligações glicídicas, ou de carboidrato esterase, que hidrolisam as ligações do tipo éster dos grupos laterais de ferulato e de acetato. Alguns exemplos de hemicelulases são as xilanases, β -mananases, α -L-arabinofuranosidases, α -D-glucuronidases, β -xilosidases e hemiceluloses esterases (Figura 2) (SHALLON; SHOHAM. 2003).

Bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Thermotoga*, *Xanthomonas*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Geobacillus* e *Lysinibacillus* (SHALLON; SHOHAM. 2003; ALVES-PRADO et al., 2010), fungos filamentosos dos gêneros *Neosartorya*, *Thermomyces*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e leveduras dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*, *Aureobasidium* e *Pichia* (LEE et al., 1986; SHALLON; SHOHAM, 2003; ALVES-PRADO et al., 2010; DEVI; KUMAR, 2012; AZAD; HOSSAIN; HALIM, 2013; HO; LYLIA, 2015; OTERO et al., 2015) foram relatados como produtores de hemicelulases.

Os fungos filamentosos são normalmente empregados na produção industrial de hemicelulases devido a sua alta capacidade de produção de enzimas extracelulares (GOSWAMI; PATHAK, 2013). As hemicelulases fúngicas geralmente possuem atividade em pH ácido e em temperaturas entre 45 e 60°C, sendo úteis na maceração e clarificação de sucos e vinhos, já que o baixo pH destes produtos limita o uso de diversas outras enzimas (YEGIN, 2017).

A levedura *Aureobasidium* sp. NRRL Y-2311-1 foi capaz de crescer em fibra de milho pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e produziu celulases e hemicelulases, especialmente xilanases e arabinases (LEATHERS; GUPTA, 1996). Yegin (2017) purificou uma xilanase ácida desta mesma linhagem de levedura, identificada como *A. pullulans* NRRL Y-2311-1. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 4,0 e 30-50°C, respectivamente, sendo estável entre pH 3 e 8, além de manter sua atividade quase inalterada por uma hora em meio com até 10% (v/v) de etanol ou com concentrações de NaCl variando entre 0 e 20% (m/v). Estas características indicam esta xilanase como boa candidata em aplicações envolvendo a preparação de massas para a indústria alimentícia (atividade em

temperaturas moderadas), preparação de alimentos salinos e frutos do mar (halotolerância), produção de bioetanol (tolerância a 10% de etanol) e indústria de suco de frutas, vinhos e alimentação animal (acidotolerância).

As hemicelulases de origem bacteriana atuam em faixas temperaturas e de pH levemente maiores que as fúngicas. Além disso, muitas são livres de celulases, sendo úteis nas indústrias de polpa e papel (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014). Kumar et al. (2017) purificaram uma xilanase de *Bacillus amyloliquefaciens* SK-3 isolado de amostras de solo próximo a uma indústria de polpa e papel na Índia. A enzima foi capaz de manter 65% de atividade quando incubada a 60°C durante 60 min, apresentando atividade máxima em 50 °C e pH 9,0. Um preparado enzimático purificado foi utilizado em teste de pré-branqueamento da polpa Kraft de madeira de lei em pH 9,0 e 60°C na ausência e na presença de sorbitol, resultando na redução de 18,3% e 23,8% do número Kappa, grandeza proporcional ao conteúdo de lignina (responsável pela coloração escura da polpa). A enzima foi, portanto, capaz de reduzir o teor de lignina da polpa testada, comprovando sua capacidade de biobranqueamento.

As hemicelulases podem ser usadas na sacarificação de hemiceluloses, auxiliando o processo de conversão de resíduos lignocelulósicos em pentoses e hexoses fermentáveis (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015; GONÇALVES, G. et al., 2015). São utilizadas como auxiliares no processo de biobranqueamento de biomassa nas indústrias de papel, para o melhoramento de ração animal, no processamento de farinha para panificação e na síntese de oligossacarídeos, fluoroglicídios e tioglicídios por parte de hemicelulases geneticamente modificadas (PÉREZ et al., 2002; SHALLON; SHOHAM, 2003; MA; YANG, 2015).

2.3.3 Enzimas lignolíticas

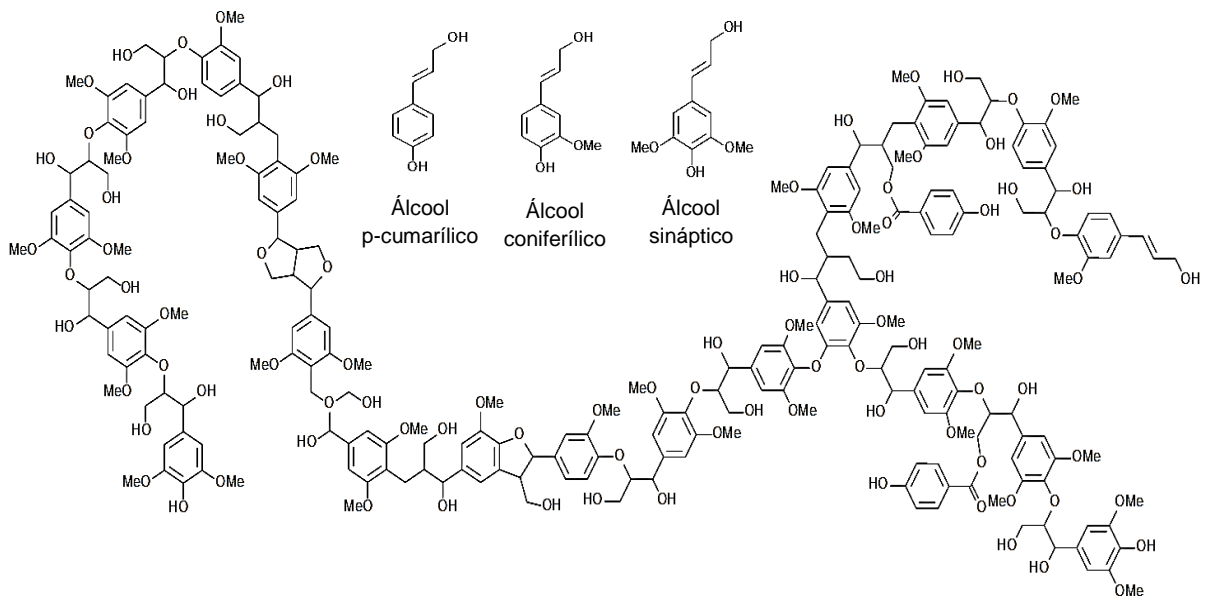
A lignina é um dos principais componentes da madeira e se encontra associada à hemicelulose e à celulose, formando a parede celular de plantas. É um polímero formado por monômeros aromáticos (álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) conectados de diferentes formas (Figura 3), possui natureza predominantemente hidrofóbica e serve a diversos propósitos, como fornecer a superfície capilar hidrofóbica necessária para o transporte de nutrientes via solução aquosa das raízes para as folhas, além de conceder a rigidez necessária para a

estabilidade estrutural e proteger a planta de ataques microbianos (VANHOLME et al., 2010; LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

Em razão de sua resistência química, a lignina é o principal obstáculo para a conversão de material lignocelulósico em produtos de maior valor agregado (etanol, butanol, etc.) via fermentação (LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012). Apesar de tamanha resistência, alguns microrganismos, especialmente os fungos da podridão branca, são capazes de degradar lignina via produção de enzimas oxidativas (lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidase versátil, lacases, tirosinases e outras polifenoloxidasas) (ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002; MACIEL; SILVA; RIBEIRO, 2010; LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

Além de degradação de lignina, tais enzimas oxidativas possuem diversas aplicações biotecnológicas, sendo as lacases, tirosinases e outras polifenoloxidasas de especial interesse por utilizarem oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, não sendo necessário o uso de agentes oxidantes adicionais, tais como o peróxido de hidrogênio. Além disso, formam água como coproduto, o que as torna catalisadores verdes ideais (UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL, 2016).

Figura 3 – Modelo estrutural de lignina.



Fonte: adaptado de Vanholme et al. (2010)

2.3.3.1 Lacases

Lacases são enzimas que catalisam a oxidação de diversos compostos aromáticos, especialmente aqueles contendo grupos $-NH_2$ e $-OH$ como

substituintes. São descritas como proteínas pertencentes à família multi-cobre e são classificadas como polifenoloxidasas, mais especificamente como bezenodiol: oxigênio oxidoreduases (EC. 1.10.3.2). Catalisam reações de oxidação envolvendo quatro elétrons com concomitante redução de oxigênio molecular a água (SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2006; SIVAKUMAR et al. 2010; MARGOT et al., 2013).

Lacases já foram encontradas em plantas, fungos e bactérias e parecem assumir uma série de funções distintas dependendo do organismo e da localidade onde são encontradas. Bactérias dos gêneros *Aquifex*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Leptothrix*, *Marinomonas*, *Oceanobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Xanthomonas* (SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2006), fungos filamentosos dos gêneros *Coprinopsis*, *Trametes*, *Rigidoporus*, *Cerrena*, *Coriolus*, *Lentinus*, *Pycnoporus*, *Steccherinum*, *Melanocarpus*, *Thielavia*, *Botrytis*, *Schizophyllum* e *Pleurotus* (RIVERA-HOYOS et al., 2013) e as leveduras *Yarrowia lipolytica* (KALYANI et al. 2015) e *Cryptococcus neoformans* (EISENMAN et al. 2007) foram relatados como produtores de lacases.

As lacases possuem diversas funções biológicas, tais como a formação de pigmentos, oxidação de compostos fenólicos, pigmentação de esporos, resistência a UV e a elevadas concentrações de Cu^{2+} , oxidação de Mn^{2+} , destruição de espécies reativas de oxigênio, despolimerização de lignina, entre outros (SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2006; KUNAMNENI et al., 2008, RIVERA-HOYOS et al., 2013).

A produção industrial de lacases é economicamente desfavorável porque a maioria das linhagens utilizadas possui baixo rendimento de produção. Diversos estudos envolvendo o isolamento de linhagens naturais mais eficientes, bem como a otimização do meio de produção têm sido realizados (YANG et al. 2017).

Lacases possuem diferentes potenciais redox, podendo ser classificadas em dois grupos: baixo potencial (0,4-0,6 V) e alto potencial (0,6-0,8 V) (SUBRAMANIAN; RAMESH; KALAISELVAM, 2014). As lacases de maior potencial possuem capacidade de oxidar uma variedade maior de substratos, sendo preferidas do ponto de aplicações biotecnológicas. Enquanto que as lacases fúngicas são, em sua maioria, extracelulares e geralmente possuem alto potencial redox (0,45-0,79 V), as lacases bacterianas, na maioria das vezes intracelulares, têm potencial redox baixo (0,4-0,5V), mas são mais termicamente estáveis que as contrapartes fúngicas (CHANDRA; CHOWDHARY, 2015; UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL, 2016; YANG et al. 2017).

Guan et al. (2014) clonaram o gene CotA-laccase de *Bacillus pumilus* W3 e o superexpressaram em *Escherichia coli*. A enzima recombinante purificada apresentou ampla faixa de pH para catálise com diferentes substratos (pH ótimo 4,6, 7,2, 7,8 para ABTS, siringaldazina e 2,6-dimetóxiifenol, respectivamente) e temperatura ótima de 80°C. Além disso, se mostrou estável numa ampla faixa de pH, apresentando 130% e 169% da atividade inicial quando incubada a 50°C durante dez dias em pH 7 e 9, respectivamente. Além disso, a enzima apresentou termoestabilidade notável, com tempo de meia vida de 6,5 e 2h quando incubada 80 e 90°C, respectivamente. Com base nas propriedades observadas, os autores testaram a capacidade de a enzima purificada descolorar os corantes vermelho reativo 11, azul reativo 171, azul reativo 4 e azul brilhante reativo em solução alcalina (pH 9,0), sendo capaz de descolorar mais de 90% de todos os corantes após 5h de incubação com siringato de metila como mediador redox.

Kalyani et al. (2015) expressaram heterologicamente, usando a levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão, o gene da enzima YLac, uma lacase de *Y. lipolytica*. A enzima recombinante apresentou potencial redox de 0,770 V, temperatura ótima de 70°C (ABTS como substrato) e pH ótimo entre 3 e 5, dependendo do substrato utilizado. Além disso, apresentou tempo de meia vida de 480 min, 160 min e 42 min para as temperaturas de 60, 65 e 70 °C, respectivamente. A enzima foi utilizada para a remoção de fenóis inibitórios para a celulase de biomassa lenhosa antes de hidrólise enzimática. Os resultados mostraram um aumento de 43% na liberação de glicídios redutores para a biomassa tratada com relação a não tratada, sendo mais eficiente que a lacase comercial de *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich).

Lacases têm potencial para aplicação em diversos setores. São usadas na deslignificação de material lignocelulósico, no biopolpamento da madeira e biobranqueamento da polpa de madeira e na degradação de corantes, pesticidas, explosivos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros (MADHAVI; LELE, 2009; RIVERA-HOYOS et al., 2013). Além disso, são utilizadas em processos sintéticos, tais como em reações de polimerização enzimática para a síntese de polifenóis [policatecol, poli(1-naftol), poli(2,6-dimetil-1,4-oxifenileno)], oxidação de derivados de glicídios, síntese de polianilina condutora, síntese de derivados de hormônios, entre outros (KUNAMNENI et al., 2008).

2.3.3.2 Tirosinase

Tirosinases são proteínas multi-cobre. Podem ser encontradas numa variedade de organismos, desde bactérias até mamíferos, estando envolvidas numa série de processos biológicos, como na biossíntese de melaninas e polifenóis (flavonoides e taninos), na resposta de defesa em fungos e plantas, no escurecimento enzimático, na detoxificação dos produtos de degradação da lignina, entre outros (ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002; AGARWAL et al., 2014). Apresentam duas atividades distintas, a de monofenol monooxigenase (cresolase ou monofenolase, EC 1.14.18.1), catalisando a *orto*-hidroxilação de monofenóis, e a de *o*-difenoil: oxigênio oxidorreductase (difenolase ou catecolase, EC 1.10.3.1), catalisando a oxidação de *orto*-difenois a *orto*-quinonas (DALFARD et al., 2006; ZAIDI et al., 2014).

Bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Marinomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Thermomicrobium*, *Ralstonia*, *Myrothecium*, *Miriococcum*, *Alteromonas*, *Sinorhizobium* e *Verrucomicrobium* (SOLANO et al., 1997; DALFARD et al., 2006; AGARWAL et al., 2014; ZAIDI et al., 2014), fungos dos gêneros *Neurospora*, *Agaricus*, *Lentinula*, *Mucor*, *Pycnoporus*, *Amanita*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetotomastia*, *Ascovaginospora*, *Trametes* e *Trichoderma* (RAVAL; VASWANI; MAJUMBER, 2012; AGARWAL et al., 2014; ZAIDI et al., 2014) e as leveduras *Exophiala jeanselmei*, *S. cerevisiae*, *Trichosporon akiyoshidainum* e *Geotrichum candidum*, (ROY; NAYAK; PANDEY, 1989; JADHAV et al., 2007; PAJOT; FARIÑA; FIGUEROA, 2011; BLEVE et al. 2011) foram relatados como produtores de tirosinases.

Em vista de sua versatilidade catalítica, as tirosinases possuem diversas aplicações. Uma das características mais importantes com relação às aplicações biotecnológicas é a capacidade de preservar a atividade enzimática em diferentes condições, tais como ampla faixa de temperatura e pH (ROY et al., 2014).

Shuster e Fishman (2009) clonaram em *E. coli* o gene da tirosinase de *Bacillus megaterium*. A enzima recombinante foi purificada e apresentou ambas as atividades máximas de monofenolase e difenolase na temperatura de 50°C e pH 7,0, sendo estável em temperaturas de até 50°C. Esta tirosinase exibiu aumento de atividade na presença de solventes orgânicos miscíveis com água (112%, 101% e 170% em 50% etanol, metanol e 30% DMSO, respectivamente), diferente da enzima de cogumelo, que foi inibida. Estes resultados sugerem potencial de aplicação da

tirosinase de *B. megaterium* em síntese orgânica, que utilizada de solventes orgânicos para aumentar a solubilidade de muitos substratos em sistemas aquosos.

A maioria estudos envolvendo aplicações de tirosinases faz uso da enzima produzida pelo cogumelo *Agaricus bisporus*. Entretanto, as de origem bacteriana demonstraram possuir propriedades catalíticas similares, podendo ser usadas nas mesmas aplicações, com a vantagem de que são mais facilmente produzidas em formas recombinantes em sistemas de expressão modelo tais como *E. coli*. Isto possibilita a produção de quantidades suficientes da enzima e facilita os estudos em engenharia de proteínas. Estas características concedem potencial às tirosinases bacterianas para aplicações futuras (FACCIO et al., 2012).

As tirosinases podem ser utilizadas para a síntese de L-DOPA (L-diidroxifenilalanina), um composto utilizado no tratamento do mal de Parkinson, através da hidroxilação de tirosina. Podem também ser usadas na formação de grupos quinona reativos em proteínas ou peptídeos para conjugação cruzada com outros materiais, na síntese de melaninas e polifenóis a partir de fenóis e catecóis, na detecção de compostos fenólicos via biossensor com tirosinase imobilizada, remoção de compostos fenólicos de efluentes, entre outros (IKEHATA; NICELL, 2000; RAVAL; VASWANI; MAJUMBER, 2012; ZAIDI et al., 2014).

2.3.4 Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de ligações peptídicas em peptídeos e proteínas, resultando na formação de peptídeos menores ou aminoácidos livres. São encontradas em todos os organismos e possuem papel fundamental na manutenção do ciclo de vida, regulando a ativação, síntese e reciclagem de proteínas (JABALIA; MISHRA; CHAUDHARY, 2014).

As proteases microbianas de interesse biotecnológico podem ser intracelulares, necessárias para diversos processos metabólicos e celulares, e extracelulares, onde são utilizadas para a hidrólise e posterior absorção de aminoácidos livres (KHAN, 2013; JABALIA; MISHRA; CHAUDHARY, 2014).

As proteases podem ser classificadas em três grupos de acordo com o pH ótimo de atividade, sendo classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas. Dentre estes, as pertencentes ao último são mais predominantes entre as produzidas por bactérias, fungos filamentosos e leveduras e geralmente possuem atividade ótima na faixa de pH 9-11 e temperaturas entre 50°C e 70°C, com algumas exceções. Em

razão destas propriedades, algumas destas proteases são ideais para aplicação em detergentes, sendo mais adequadas as mais ativas entre pH 8 e 12 e 50°C e 70°C (JISHA et al., 2013).

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Myxococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Curtobacterium*, *Colwellia*, *Pedobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Norcardiopsis*, *Pimelobacter*, *Hyphomonas*, *Lysinibacillus* (HEREDIA-SANDOVAL et al., 2016; KHAN, 2013; KUDDUS; RAMTEKE, 2012; JISHA et al., 2013; MECHRI et al., 2017), fungos filamentos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermoascus*, *Themomyces*, *Mucor*, *Humicola*, *Cephalosporium*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Tritirachium*, *Entomophthora*, *Paecilomyces* (POZA et al. 2001; RODARTE et al., 2011; JISHA et al., 2013; SOUZA et al., 2015) e leveduras dos gêneros *Citeromyces*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Candida* e *Rhodotorula* (CHI et al., 2007; RAO et al., 2011; CHAUD et al., 2016) já foram relatados como produtores de proteases.

As proteases possuem diversas aplicações industriais. São usadas na indústria alimentícia para produção de hidrolisados proteicos, clarificação de sucos e licores reduzindo a turbidez; para modificação de glúten em produtos de panificação, no processo de precipitação da caseína na fabricação de queijos etc.. Podem ser usadas como aditivos em detergentes para remoção de manchas de origem proteica, como sangue, leite, grama, etc. (KUDDUS; RAMTEKE, 2012; KHAN, 2013; SOUZA et al., 2015; HEREDIA-SANDOVAL et al., 2016).

A triagem enzimática de microrganismos é uma metodologia útil na descoberta de proteases com características industrialmente desejáveis. Mechri et al. (2017) purificaram uma protease alcalina produzida por *Lysinibacillus fusiformis* C250R isolado de um campo de óleo geotérmico da Tunísia e relataram que se tratava de uma serino-protease com atividade na faixa de pH 3 a 13, sendo ótima em pH 10 e estável entre pH 5 e 10. A temperatura ótima foi em torno de 70°C na presença de cálcio e 60° na ausência deste. A enzima não foi afetada pela presença de 200 mM de NaCl e se revelou mais estável na presença de detergentes sólidos e líquidos que a protease comercial Alcalase Ultra 2.5 L, sendo também mais eficiente na remoção de manchas de sangue em processo de lavagem com detergente.

Hammami et al. (2017) isolaram uma linhagem de *Bacillus invictae* capaz de produzir altas concentrações de protease extracelular (2000 U/mL) em 24h de

cultivo. O extrato bruto se apresentou estável em valores de pH entre 6,0 e 12,0, sendo mais ativo entre pH 9,0 e 11 com pico de atividade em torno de pH 10 e na temperatura de 60°C. O extrato enzimático se mostrou estável entre 30 e 50°C e na presença de detergentes não iônicos (Tween 20 e Tween 80), peróxido de hidrogênio a 1% (v/v) e de perborato de sódio a 0,1% (m/v), apresentando características desejáveis para a sua utilização como aditivo em detergentes. Sua aplicabilidade foi comprovada pela desproteínização efetiva de resíduos de casca de camarão e remoção de manchas de sangue em ação conjunta com detergente comercial.

Outras áreas de aplicação incluem a indústria farmacêutica e de cosméticos, principalmente pela atividade queratolítica; na síntese de peptídeos biologicamente ativos, entre outras (KUDDUS; RAMTEKE, 2012; KHAN, 2013; SOUZA et al., 2015; HEREDIA-SANDOVAL et al., 2016).

2.3.5 Esterases e lipases

Enzimas lipolíticas são aquelas capazes de catalisar a hidrólise de ésteres carboxílicos em ácidos carboxílicos e álcool em meio aquoso e a esterificação e transesterificação em meio não aquoso. Podem ser divididas em duas grandes classes, as lipases verdadeiras (EC 3.1.1.3 lipases de triacilgliceróis) e esterases (EC 3.1.1.1 carboxilesterases) (LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; SISO, 2014).

A principal característica utilizada para diferenciar uma lipase verdadeira de uma esterase é a preferência por substratos. Enquanto que as esterases têm maior preferência por ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia curta com maior solubilidade em água, as lipases tem maior afinidade por ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa (> 12 átomos de carbono) e baixa solubilidade em água (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; SISO, 2014).

Devido à facilidade com a que são produzidas, lipases de origem microbiana são preferidas às de animais ou de plantas (GUPTA, R et al., 2015). Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Streptomyces*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Lysinibacillus* (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; RAJESH et al., 2013), fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Thermomyces*, *Gilbertella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Umbelopsis* e leveduras dos gêneros *Kurtzmanomyces*, *Malassezia*, *Saccharomyces*,

Cryptococcus, *Candida*, *Geotrichum*, *Galactomyces* e *Yarrowia* (KOTOGÁN et al., 2014; GUPTA, R. et al., 2015) foram relatados como produtores de lipases e/ou esterases.

Propriedades das lipases e esterases tais como estabilidade térmica, especificidade de substrato, seletividade enzimática, temperatura e pH ótimos variam com de acordo com o organismo produtor. As de origem bacteriana, por exemplo, tendem a ter temperatura e pH ótimos na faixa de 30-65°C e 4,0-11,0, respectivamente (BORA; GOHAIN; DAS, 2013), sendo a maioria não específica quanto ao substrato utilizado, enquanto que algumas são termoestáveis (NAGARAJAN, 2012).

Gricajevaa, Bendikienè e Kalèdienè (2016) superexpressaram uma lipase de *Bacillus stratosphericus* L 1 em *E. coli*. A enzima recombinante purificada apresentou atividade máxima (6244,5 U/mg) em 35°C e pH 9,0, sendo estável em temperaturas entre 35-55°C (60% de atividade após 4h de incubação). Apesar de ser específica para alcanos de p-nitrofenila de cadeia curta, a enzima também foi capaz de hidrolisar ésteres de cadeia média e longa, além de substratos graxos naturais (óleos e gorduras animais) e de ser ativada por solventes orgânicos (acetona e n-hexano). Estas características apontam a lipase caracterizada como tendo potencial para síntese orgânica.

O gene de uma lipase de *Candida antarctica* ZJB09193 foi clonado e superexpresso em *P. pastoris*. A enzima recombinante apresentou atividade máxima em pH 8,0 e 52 °C, sendo estável entre pH 5,0-10,0 (acima de 85% de atividade residual) e em temperaturas até 40°C, sendo moderadamente termoestável. A enzima foi imobilizada em substrato têxtil e utilizada com sucesso na transesterificação do acetato de vitamina A com diferentes ácidos graxos (87% de rendimento após otimização) (LIU et al., 2012).

Enzimas lipolíticas ser utilizadas na indústria alimentícia para a síntese de ésteres de ácidos graxos e de moléculas bioativas, na resolução de compostos quirais, como catalisadores em síntese orgânica, como aditivos em detergentes, como biorreceptor em biossensores para detecção de lipídeos (triglicerídeos ou colesterol, por exemplo), na modificação de óleos e gorduras, entre muitas outras aplicações (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; HASAN; SHAH; ABDUL, 2006; WANG et al., 2013; GUPTA, R. et al., 2015).

2.3.6 Amilases

O amido é o segundo polissacarídeo mais abundante no mundo e é usado principalmente como reserva de energia pelas plantas. É composto por duas frações: a amilose, formada de monômeros de glicose conectados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, e a amilopectina, formada por monômeros de glicose conectados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 com ramificações ocorrendo em α -1,6 (MAAREL; LEEMHUIS, 2013).

A biodegradação de amido ocorre pela ação enzimática de amilases, que são divididas em dois grupos distintos, as exoamilases e as endoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise do amido em sítios aleatórios da cadeia polimérica resultando na formação de oligossacarídeos lineares e ramificados. As exoamilases agem a partir da extremidade não redutora da molécula, resultando na formação de produtos finais de cadeia curta (GUPTA et al., 2003).

Cada tipo de amilase catalisa reações com produtos finais diferentes. As α -amilases (EC 3.2.1.1) são endoamilases cujos produtos finais de hidrólise são glicose, maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos solúveis, as β -amilases (EC 3.2.1.2) são exoamilases cujo produto final de hidrólise é a maltose, enquanto que as glicoamilases (EC 3.2.1.3) são exoamilases cujo produto final de hidrólise é a glicose (WU et al., 2014; KARIM et al., 2016). Além disso, há outros tipos de enzimas modificadoras de amido que levam à produção de diversos produtos como ciclodextrinas, oligossacarídeos lineares, entre outros (MOJSOV, 2012; MAAREL; LEEMHUIS, 2013).

A capacidade de produção de amilases já foi relatada tanto para fungos filamentosos e leveduras (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Epicoccum*, *Stenocarpella*, *Hyphopichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*) (MANITCHOTPISIT et al., 2011; ABE et al., 2015; SAHNI; GOEAL, 2015; OLIVEIRA et al., 2015; PAUL, 2016) quanto para bactérias (*Bacillus*, *Alteromonas*, *Kurthia*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Geobacillus*) (MOHAPATRA; BAPUJI; SREE, 2003; MOJSOV; 2012; NAIDU; SARANRAJ, 2013; PAUL, 2016).

De modo geral, o pH ótimo de atuação das amilases varia na faixa de 2 a 12, sendo ácido ou neutro para a maioria das de origem bacteriana ou fúngica. São geralmente estáveis numa faixa de pH entre 4 e 11. A temperatura ótima de atuação da enzima depende da natureza do microrganismo produtor – se é mesofílico ou

termofílico (SARANRAJ; STELLA, 2013). A amilase de uma cepa termofílica de *Bacillus subtilis* apresentou atividade máxima em pH 6,0 e 70°C (PARK et al., 2013), enquanto que as produzidas por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* apresentaram atividade máxima em pH 7,0 e 60°C (OLIVEIRA et al., 2015).

Termoestabilidade, atividade em ampla faixa de pH e na presença de agentes desnaturantes (detergentes, solventes orgânicos, altas concentrações de sal) são características importantes para aplicações industriais de amilases (SOUSA; MAGALHÃES, 2010; SHAFIEI; ZIAEE; AMOOZEGAR, 2012).

Roy e Mukherjee (2013) isolaram a bactéria *Bacillus licheniformis* AS08E capaz de crescer e produzir α -amilase em pH 12,5. A enzima purificada apresentou atividade máxima em pH 10,0 e 80°C, sendo estável em pH 6,0-12 e temperaturas de até 60°C (incubada na ausência de amido ou Ca^{2+}) e na presença de detergentes comerciais, sendo mais estável que a α -amilase comercial (Hi-media Laboratories, Índia). Nos testes de remoção de manchas amilolíticas realizado pelos autores, a aplicação da α -amilase de *B. licheniformis* AS08E purificada em conjunto com detergente foi mais efetiva que a aplicação de detergente sem enzima.

As enzimas amilolíticas são usadas como aditivos em detergentes para remoção de manchas de amido, na produção de xaropes de glicose a partir de amido, na sacarificação de biomassa baseada em amido para produção de etanol por fermentação, para aumentar a digestibilidade de carboidratos utilizados nas indústrias de alimentação animal, como suplemento alimentício para melhoramento da digestão humana, na assistência da síntese de nanopartículas, entre muitas outras aplicações (MOJSOV; 2012; MISHRA; SARDAR, 2012; NAIDU; SARANRAJ, 2013; MISHRA; SARDAR, 2014; AHMAD et al., 2015; SAHNI; GOEAL, 2015; PAUL, 2016)

2.3.7 Pectinases

Substâncias pécticas ou pectinas são polissacarídeos naturais presentes na lamela média e parede celular de plantas terrestre e são formadas maioritariamente por monômeros de ácido D-galacturônico conectados por ligações glicídicas do tipo α -1,4, sendo possível encontrar resíduos de L-ramnose como cadeias laterais. Além disso, alguns dos grupos carboxila podem ser encontrados como carboxilato, formando sais de ácido urônico ou ser esterificados com grupos metila, conferindo

maior ou menor grau de metilação à molécula de pectina (CIRIMINNA et al., 2015; ADETUNJI et al., 2017).

Em razão das diversas estruturas encontradas, as substâncias pécticas podem ser classificadas em quatro grupos: protopectinas, a pectina encontrada em seu estado natural na parede celular das plantas, insolúvel e de onde todas as outras substâncias pécticas são derivadas; ácido pectínico, ácido poligalacturônico coloidal contendo vários grupos carboxila metil esterificados; ácido péctico, ácido poligalacturônico coloidal sem grupos esterificados; e pectinas, caracterizadas por uma mistura de substâncias pécticas de diferentes composições com ácido pectínico como constituinte maioritário (TAPRE; JAIN, 2014).

As pectinas são encontradas mais abundantemente em frutas e vegetais, concedendo força e flexibilidade à parede celular, além de possuir uma variedade de funções biológicas, tais como adesão e proliferação celular, sinalização, entre outros (CIRIMINNA et al., 2015).

A biodegradação das substâncias pécticas ocorre por ação de enzimas chamadas pectinases, que são classificadas em três grupos principais de acordo com seu modo de ação: as hidrolases (poligalacturonase (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67 e EC 3.2.1.82) e polimetilgalacturonase), que promovem a da ligação glicídica α -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico; as pectinaesterases (EC 3.1.1.11), responsáveis pela desesterificação dos grupos metoxila da pectina; e as liases (poligalacturanato liase (EC 4.2.2.2 e EC 4.2.2.9) e polimetilgalacturanato liase (EC 4.2.2.10)), que catalisam a quebra da ligação glicídica α -1,4 através de uma reação de trans-eliminação com formação de galacturanatos e metilgalacturanatos, respectivamente (GARG et al., 2016).

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Staphylococcus*, *Pectobacterium*, *Cellvibrio* e *Klebsiella*. (UENOJO; PASTORE, 2007; CHAUDHRI; SUNEETHA, 2012; RAJU; DIVAKAR, 2013; TAPRE; JAIN, 2014; GARG et al., 2016;), fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Botryotinia*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Chaetomium* (REZENDE et al., 2013; CHAUDHRI; SUNEETHA, 2012; REDDY; SREERAMULU, 2012) e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Stephanoascus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Cystofiliobasidium*, *Rhodotorula*, *Mrakia*

(ALIMARDANI-THEUIL, GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011) foram relatados como produtores de pectinases.

Pectinases são utilizadas comumente na indústria de processamento de alimentos, pois auxiliam na diminuição da viscosidade de macerados de frutas e vegetais, facilitando sua manipulação e filtração. Além disso, aumentam o rendimento de extração do suco, possuem capacidade de clarificação do extrato de fruta ou vegetal e de aumentar sua estabilidade. São aplicadas indústria de vinhos, onde auxiliam no processo de extração, maximizam o rendimento de suco extraído, facilitam o processo de filtração e intensificam a cor e o sabor. Podem ser usadas na sacarificação de resíduos agroindustriais ricos em pectina, no auxílio na extração de óleos vegetais em sistema aquoso, no tratamento de fibras naturais na indústria têxtil, no biobranqueamento da polpa de madeira, na descoloração de resíduos de papel para reciclagem etc. (CHAUDHRI; SUNEETHA, 2012; TAPRE; JAIN, 2014; GARG et al., 2016).

Duas das principais características utilizadas para seleção de pectinases para aplicações na indústria de alimentos são suas temperaturas e pH ótimos. Quando utilizadas para extração do suco de frutas, as pectinases de origem fúngicas são preferidas por possuírem pH ótimo próximo ao desses sucos (pH 3,0-5,5). Já a aplicação na fabricação de suco de vegetais de purês exigem enzimas com pH ótimo mais próximo da neutralidade. Além disso, a baixa estabilidade térmica das pectinases fúngicas utilizadas comercialmente não permitem que temperaturas superiores a 45°C seja utilizadas, necessitando que uma etapa de pasteurização seja utilizada para minimizar a possibilidade de crescimento de microrganismos mesofílicos (KAR; RAY, 2011).

Kar e Ray (2011) purificaram uma exo-poligalacturonase termoestável de *Streptomyces erumpens*. A enzima se apresentou estável em pH 7,0 e 50°C. O desempenho na extração de suco de frutas e vegetais do extrato bruto foi comparado uma pectinase comercial (Pectinex, Novozymes), apresentando um aumento de 15-20% no rendimento de extração com relação à enzima comercial.

2.3.8 DNAses

Existem microrganismos capazes de produzir enzimas extracelulares, chamadas desoxirribonucleases (DNAses), cuja atividade consiste em hidrolisar as ligações fosfodiéster presentes nos ácidos desoxirribonucleicos (KAMBLE; KAMBLE;

MUSADDIQ; 2011). As DNases extracelulares possuem várias funções, tais como a obtenção de nutrientes através da degradação do DNA presente no meio, controle de crescimento bacteriano em biofilme, fator de virulência, entre outros (DESHMUKH; SHANKAR, 2004; FONTAINE; PEREZ-CASAL; WILLSON, 2004; HICKEY et al., 2013; KRANTHI; APARNA; SARADA, 2014)

Bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Halomonas* (DESHMUKH; SHANKAR, 2004; FONTAINE; PEREZ-CASAL; WILLSON, 2004; BERRADA et al., 2012; HICKEY et al., 2013; KRANTHI; APARNA; SARADA, 2014) e leveduras dos gêneros *Cryptococcus*, *Endomyces*, *Tremella*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Lipomyces*, *Pichia* (CAZIN et al, 1969; TABUCHI et al., 1981; SÁNCHEZ; COLOM, 2010) já foram relatados como produtores de DNases.

As DNases são ferramentas poderosas para a biologia molecular, pois podem ser utilizadas para introduzir cortes em determinadas regiões da molécula de DNA, seja numa fita simples ou dupla, o que possibilita a inserção de DNA estrangeiro, por exemplo. Além disso, podem ser utilizadas para estudo de capacidade de ligação de proteínas ao DNA, remoção de genes prejudiciais, em terapia gênica para doenças genéticas, em outras técnicas de engenharia genética, entre outros (SHUKLA; 2009; KAMBLE; KAMBLE; MUSADDIQ; 2011)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas da casca do coco-verde em fermentação.

3.2 Objetivos Específicos

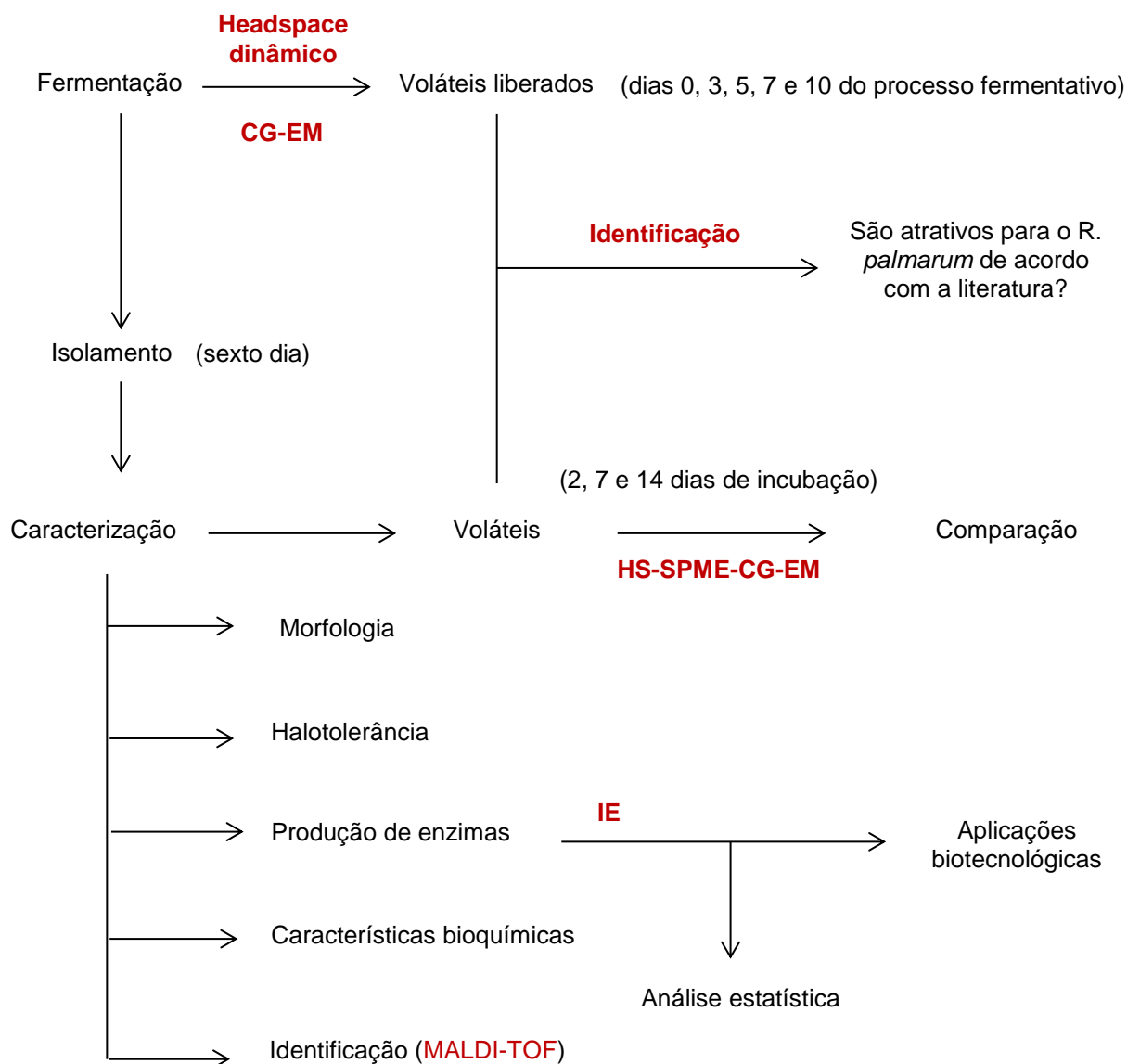
- Isolar as bactérias e leveduras da casca do coco-verde em fermentação no dia de maior produção de voláteis de interesse (sexto dia);
- Caracterizar morfológica, fisiológica e bioquimicamente os isolados obtidos;
- Avaliar o potencial biotecnológico através de determinação de habilidade de secretar enzimas de interesse industrial e biotecnológico (celulases, xilanasas, lacases, tirosinases, polifenoloxidasas, amilases, lipases/esterases, proteases e DNAses);
- Investigar a produção de voláteis em meio de cultura por linhagens selecionadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia Geral Adotada

Os procedimentos realizados neste trabalho estão resumidos em forma de esquema na Figura 4.

Figura 4 – Esquema da estratégia utilizada na execução deste trabalho.



Fonte: o autor (2017)

4.2 Reagentes e Equipamentos Utilizados

Para a preparação dos meios de cultura, foram utilizados: Extrato de levedura, Extrato de carne (ambos da BD Difco, EUA), Pectina de frutas cítricas,

Xilano de madeira de faia, hidrolisado enzimático de caseína, Sigmacell celulose (celulose microcristalina tipo 50), Tween 80, Azul de metileno (todos da Sigma-Aldrich), Ágar-Agar (AgarGel, Brasil e Neogen, EUA), Sulfato de estreptomicina (Biofarm, Brasil), Carboximetilcelulose de sódio INDUSKOL (Denver-Cotia, Brasil), Guaiacol (Neon Comercial LTDA, Brasil), Ácido Gálico, L-Tirosina (ambos da Dinâmica, Brasil), Vermelho congo (Vetec, Brasil) e Rosa bengala (Reagen, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza, exceto a gelatina, o leite desnatado e o amido de milho, que foram de grau alimentar.

Todos os procedimentos de manipulação de microrganismos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (Heraeus Instruments, HERA SAFE HS2, classe 2, Alemanha). Os microrganismos foram incubados em incubadora para demanda biológica de oxigênio B.O.D. (modelo 411/D, Nova ética, Brasil). Os procedimentos de esterilização e de descarte de material contaminado foram realizados em autoclave vertical (Phoenix, Brasil).

As análises de voláteis foram realizadas em cromatógrafo a gás (CG-2010 Plus, Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas (GC-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japão).

4.3 Extração e Análise de Compostos Orgânicos Voláteis

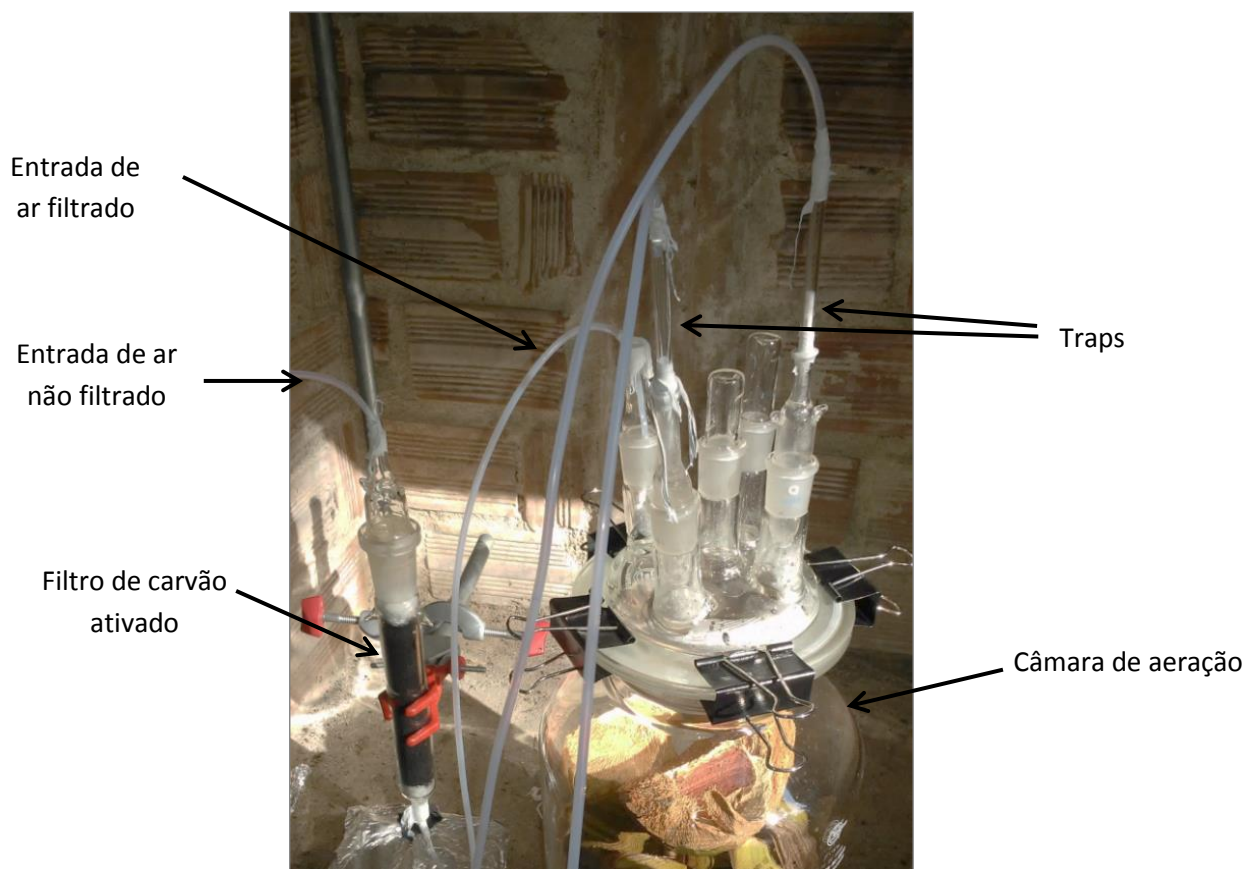
4.3.1 Extração dos voláteis emitidos pelo processo de fermentação da casca do coco-verde

Os voláteis emitidos pelo processo de fermentação foram pré-concentrados pela técnica do “*headspace*” dinâmico. Esta é uma técnica que baseada na passagem de ar pelo *headspace* da amostra cujos voláteis serão arrastados e adsorvidos por um *trap* (pequeno tubo de vidro contendo o material adsorvente).

No presente trabalho, o sistema de extração de voláteis foi composto por uma câmara de aeração de vidro, uma mangueira de entrada de ar, previamente filtrado por um filtro de carvão ativado, e *traps* com 50 mg de Porapak N (polivilpirrolidona) nas vias de saída de ar (Figura 5). O adsorvente usado nas colunas foi previamente lavado com 2 mL de hexano bidestilado e ativado por 2 h em forno a 132 °C. A aeração foi iniciada quando foram colocados os seis pedaços previamente selecionados de cascas de coco-verde na câmara de aeração, que foi fechada e a tampa presa com cliques de metal. O procedimento foi realizado à temperatura de 28

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante quatro horas. Ao final deste período, os compostos adsorvidos nos *traps* foram dessorvidos com 500 μL de hexano bidestilado, sendo a solução resultante transferida para frascos de vidro com septo de PTFE e mantida a -20°C . Após a aeração, as cascas de coco-verde foram deixadas em local aberto exposto ao Sol para o desenvolvimento do processo fermentativo. Este procedimento foi realizado nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 de fermentação.

Figura 5 - Sistema de aeração utilizado para coleta dos voláteis emitidos durante fermentação das cascas de coco-verde. O procedimento foi realizado durante quatro horas à temperatura ambiente e nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 do processo de fermentação.



Fonte: o autor (2016)

4.3.2 Extração dos voláteis emitidos por culturas puras de linhagens dos microrganismos isolados por microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME)

As linhagens escolhidas foram repicadas para meio NYDAm inclinado em tubos de vidro âmbar com tampa rosqueável e septo de PTFE. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Tubos com meio estéril foram utilizados como controle negativo, também em triplicata. Os voláteis das culturas puras, bem como os

liberados pelo meio de cultura estéril, foram coletados em três períodos distintos de incubação: 2, 7 e 14 dias à temperatura de 32°C.

A coleta dos voláteis foi realizada através de extração com fibra de SPME de PDMS de 100 µm (Supelco, Bellefonte, EUA). No início de cada coleta, a fibra foi ativada a 200°C durante 30 minutos e foi reativada por 15 minutos entre as coletas realizadas no mesmo dia. O procedimento de coleta foi realizado à temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, após o qual a agulha contendo a fibra com os voláteis adsorvidos foi para o injetor do cromatógrafo que estava a 200°C, onde permaneceu por 15 minutos para a dessorção dos analitos.

4.3.3 Análise dos Voláteis Obtidos por CG-EM

As soluções hexânicas obtidas no item 4.3.1 foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para a análise cromatográfica foi utilizado o modo de injeção *splitless* com temperatura do injetor de 200°C onde foi injetado 1 µL de amostra. A programação de aquecimento da coluna iniciou a 50 °C, onde permaneceu por 5 minutos e foi elevada a 6°/min até 250°C, onde permaneceu por 5 minutos. O tempo total da corrida foi de 43,33 minutos. A coluna utilizada foi a DB-1 (JiW Scientific, EUA) de 30,0 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi He, com corrida realizada no modo de velocidade linear e 1,2 mL/min de fluxo de gás da coluna.

As análises dos voláteis obtidos por cultura pura também foi realizada por CG-EM, porém neste caso foi utilizado outro método cromatográfico, apesar de a mesma coluna ter sido utilizada. A temperatura do injetor foi de 200°C e a rampa de aquecimento da coluna teve início a 50 °C onde permaneceu por 5 minutos, foi elevada a 5 °C/ min até a temperatura final de 180°C, totalizando em 31 minutos de análise.

A detecção foi realizada por espectrometria de massas com os seguintes parâmetros: temperatura da interface de 260°C, tempo de corte do solvente de 4,8 minutos (para as análise dos voláteis da casca de coco-verde), temperatura da fonte de íons de 220°C e impacto de elétrons de 70 eV.

O Índice de Retenção Linear (IRL) foi calculado (equação (1)) através da injeção da mistura de padrões de alcanos de C₇ até C₃₀ analisada nas mesmas condições das amostras a serem calculadas. A identificação dos compostos foi

realizada por comparação dos espectros de massa obtidos aos disponíveis na biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnológica (*National Institute of Standards and Technology*, biblioteca versão NIST08) e comparação dos valores de IRL dos compostos relatados na mesma biblioteca (disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>), para coluna com a mesma fase estacionária.

$$IRL = 100z + 100 \left(\frac{t_{R(s)} - t_{R(z)}}{t_{(z+1)} - t_{(z)}} \right) \quad (1)$$

Na equação (1), t_R é o tempo de retenção, s se refere ao composto alvo, que elui da coluna entre dois n-alcenos de referência com números de carbono z e $z+1$, z se refere ao n-alceno que elui antes do composto alvo e $z+1$ ao que elui imediatamente após (ZHANG et al., 2011)

4.3.4 Seleção dos compostos voláteis representativos

Os picos que apresentaram o mesmo IRL em pelo menos duas repetições de cada tratamento foram selecionados para posterior análise, pois nem todos os compostos foram detectados em todas as repetições de um mesmo tratamento.

4.4 Processo de Fermentação das Cascas de Coco-verde, Isolamento, Purificação e Manutenção das Bactérias e Leveduras em Laboratório

Inicialmente, os coco-verdes foram abertos, a água de coco drenada e a polpa retirada com o auxílio de uma espátula. Então, foi feita a escolha dos pedaços a serem usados no experimento tomando-se como base a capacidade da câmara de aeração, resultando em seis fragmentos selecionados. Estes ficaram expostos a céu aberto durante dez dias para desenvolvimento de processo fermentativo (Figura 6). As tentativas de isolamento ocorreram em dois momentos. O primeiro foi imediatamente após a abertura dos cocos verdes e o segundo no sexto dia de fermentação, dia cujos voláteis emitidos são mais atrativos para o *R. palmarum* (DUARTE, 2015).

Figura 6 – Aspecto das cascas de coco-verde nos dias 4 e 6 do processo fermentativo



Fonte: o autor (2015)

No primeiro momento, três fragmentos cascas de coco verde foram selecionados e identificados como as matrizes para isolamento (cascas 1, 2 e 3). Estes fragmentos foram utilizados para a confirmação de presença de microrganismos nas cascas do coco não fermentadas logo após serem abertas. O procedimento foi realizado cortando-se os fragmentos do mesocarpo com uma faca. Os fragmentos cortados foram colocados em tubos de centrifuga esterilizados. Em seguida, 10 mL de solução salina (0,9% de NaCl) estéril foram adicionados aos fragmentos, que foram macerados usando-se pistilo e graal estéreis. Cem microlitros do sobrenadante resultante foram diluídos para um volume de 10 mL com solução salina estéril, e destes, 100 μ L foram plaqueados em 4 diferentes meios de cultura (NYDA modificado, NYDA modificado/1000, Coco-ágar 1 e Rose-Bengal-ágar-estreptomicina) (APÊNDICE). No total, foram retirados fragmentos de três diferentes cascas de coco e a diluição do macerado foi plaqueada em triplicata para cada meio de cultura. As placas de Petri foram fechadas com papel filme e incubadas em B.O.D. a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 11 dias.

No segundo momento, o procedimento realizado foi o mesmo que o descrito acima, com algumas modificações. Primeiramente, foi feito o plaqueamento do macerado não diluído e do macerado diluído 100 vezes, sendo uma repetição para o não diluído e duas para o diluído. O plaqueamento foi feito em cinco diferentes meios de cultura (NYDA modificado, NYDA modificado diluído 1000 vezes, Coco-ágar1 modificado, Coco-ágar2 e Rose-Bengal-ágar-estreptomicina) (APÊNDICE). Foram utilizados fragmentos do mesocarpo das três cascas de coco usadas no

isolamento anterior, além de terem sido retirados fragmentos de endocarpo de uma das cascas utilizadas, totalizando em quatro diferentes fontes de isolamento. As placas de Petri foram fechadas com filme plástico e incubadas em B.O.D. ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) por 12 dias.

Após o aparecimento de colônias nos meios de isolamento, as que apresentaram características morfológicas distintas (tamanho, pigmentação, formato) num mesmo meio de cultura foram selecionadas e repicadas pela técnica de esgotamento, em placas de Petri com os mesmos meios de isolamento. Após duas etapas de purificação por esgotamento, as linhagens foram repicadas para placas de Petri contendo meio NYDA modificado e incubadas por 72 h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao se confirmar que as linhagens foram todas capazes de crescer em meio NYDA modificado, foi feito o repique para tubos inclinados e, após 48 h de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, os tubos foram acondicionados a 4°C . Estes tubos caracterizam as culturas estoques, que foram renovadas a cada 2 ou 3 meses.

4.5 Caracterização Bioquímica, Fisiológica e Morfológica.

4.5.1 Morfologia das colônias

As principais características morfológicas das colônias (tamanho, pigmentação, borda, textura) foram registradas tanto para o crescimento dos isolados em seus respectivos meios de isolamento quanto para o crescimento dos isolados em meio NYDA modificado (CHRISTOPHER; BRUNO, 2003).

4.5.2 Coloração de Gram

As bactérias crescidas em meio NYDA modificado a 32°C por 24h foram submetidas à coloração de Gram conforme descrita por Preston e Morrell (1962). Após o procedimento de coloração, os slides foram examinados em microscópio ótico (Modelo Amplival, Carl Zeiss Jena, Alemanha) com magnificação de 1000x utilizando-se óleo de imersão (Dinâmica, Brasil).

4.5.3 Produção de Catalase

A capacidade de produção de catalase pelos isolados foi testada através da decomposição de solução a 3% de peróxido de hidrogênio produzindo água e oxigênio. A formação de bolhas após a adição desta solução ao crescimento

microbiano indica produção de catalase. Todos os isolados foram submetidos a este teste com 72h de crescimento a 32 ± 2 °C em meio NYDA modificado. As colônias que provocaram liberação de gás em até dois minutos foram consideradas catalase positivas (TAYLOR; ACHANZAR, 1972).

4.5.4 Produção de ácido a partir carboidratos e outros substratos

Os isolados foram repicados para placas de Petri com meio apropriado para teste de fermentação de carboidratos (APÊNDICE) contendo o indicador ácido-base vermelho de fenol e incubados a $32,0 \pm 0,5$ °C. O crescimento microbiano e reação ácida ou alcalina foram registrados nas primeiras 24h e ao final do período de incubação (72h). Os carboidratos testados foram glicose, sacarose, maltose, além do poliálcool manitol.

4.5.5 Crescimento em meio manitol-sal-ágar (MSA)

A capacidade dos isolados em crescer em meio com 7,5% de NaCl e de produzir ácido a partir de manitol foi observada através do crescimento em placas de Petri com meio MSA (APÊNDICE). Os isolados foram repicados para as placas de Petri de teste e incubados a $32,0 \pm 0,5$ °C durante 72 h. Os isolados que apresentaram reação ácida (halo amarelado em contraste com o meio avermelhado) foram considerados fermentadores de manitol, enquanto que todos os isolados que apresentaram crescimento foram considerados moderadamente halotolerantes.

4.5.6 Halotolerância

A capacidade de crescimento dos isolados sob diferentes concentrações de NaCl foi testada através de crescimento em meio sólido. Os isolados foram repicados para meio NYDA modificado acrescido de diferentes concentrações de NaCl (0, 5, 10 e 15 % (m/v)) e incubados a 30 ± 2 ° por até 7 dias. O crescimento nos meios suplementados com NaCl foi comparado ao do controle e registrado após 2, 5 e 7 dias de incubação (modificado de JAOUANI et al., 2014).

4.5.7 Hidrólise de L-tirosina

A hidrólise de L-tirosina foi detectada em meio Ágar-tirosina (APÊNDICE). Este teste difere do teste de tirosinase no sentido que a tirosina é hidrolisada e utilizada como fonte de carbono ou nitrogênio, mas não é oxidada como acontece

com as tirosinases. Os isolados foram repicados para o meio de teste e incubados a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 22 dias. A L-tirosina é pouco solúvel em água, resultando numa suspensão turva ao ser adicionada ao meio. Os microrganismos capazes de hidrolisar L-tirosina formam um halo claro ao redor do crescimento. Portanto, as colônias que formaram halo claro ao serem incubados em meio Ágar-tirosina foram consideradas positivas para hidrólise de tirosina (HABIBNIA et al., 2015)

4.6 Potencial Biotecnológico dos Isolados

Os isolados foram testados, em duplicata, quanto à capacidade de produção de hidrolases e oxidases. Aqueles que apresentaram resultados positivos foram novamente testados com três a quatro replicatas biológicas para a medição de índice enzimático (IE), dado pela fórmula:

$$\text{IE} = \text{H/C} \quad (2)$$

onde H é o halo de atividade enzimática e C é diâmetro de crescimento da colônia. O índice enzimático é uma grandeza para se estimar o potencial para a produção industrial de determinada enzima (FLORENCIO; COURI; FARINAS, 2012).

Para o cálculo de índices enzimáticos, foram utilizadas suspensões de células (24h de crescimento em meio NYDA modificado) em água destilada esterilizada padronizadas com $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a escala de MacFarland. Foram aplicados 2 μL da suspensão na superfície do meio sólido de teste. As placas de Petri foram incubadas em B.O.D a $32^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 72h.

4.6.1 Avicelases

A produção de avicelases, (enzimas envolvidas na degradação de celulose microcristalina) foi testada de acordo com Gupta et al. (2012). Os isolados foram repicados para meio de cultura contendo celulose microcristalina (APÊNDICE) e incubados durante sete dias em incubadora B.O.D. a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados foram visualizados pela adição de solução aquosa de vermelho congo 0,1% por 15 minutos seguida de lavagem das placas de Petri com NaCl 1 M por 15 minutos. As colônias que formaram halo amarelado em contraste com a coloração avermelhada do meio de cultura foram consideradas produtoras de avicelase.

4.6.2 Carboximetilcelulases

A capacidade de produção de carboximetilcelulase (endoglucanase) foi testada de acordo Mendels e Reese (1957). Os isolados foram repicados para meio de cultura contendo carboximetilcelulose (APÊNDICE) e incubados durante 5 dias em B.O.D. a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados foram visualizados pela adição de solução aquosa de vermelho congo 0,1% (m/v) por 15 minutos seguida de lavagem das placas de Petri com NaCl 1 M por 15 minutos. As colônias que formaram halo amarelado em contraste com a coloração avermelhada do meio de cultura foram consideradas produtores de carboximetilcelulase.

4.6.3 Xilanases

A capacidade de produção de xilanases, um tipo de hemicelulase, foi testada por observação da degradação do xilano de madeira de faia em meio NYDA com a glicose sendo substituída pelo xilano (APÊNDICE), conforme descrito por vários autores (SRIDEVI; CHARYA, 2011; KULKARNI; GUPTA, 2013). Os isolados foram repicados para o meio de teste e incubados em B.O.D. a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 h. Depois deste período, a superfície do meio foi coberta com solução de lugol, que forma um complexo colorido com o xilano, possibilitando a visualização das zonas de degradação do mesmo. As colônias que apresentaram halo claro no meio foram consideradas produtoras de xilanases (NAIDU et al., 2015).

4.6.4 Pectinases

A produção de enzimas pectinolíticas foi testada de acordo com Cattelan (1999) e revelada de acordo com Raju e Divakar (2013). Os isolados foram repicados para meio de cultura sólido contendo pectina (APÊNDICE) e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h. Após o período de incubação, as placas de Petri foram cobertas com solução de lugol, que reage com a pectina e forma um complexo de coloração amarronzada. Os isolados que apresentaram halo claro amarelado ao redor das colônias foram considerados produtores de pectinases.

4.6.5 Amilases

A capacidade de produção de enzimas amilolíticas foi testada utilizando-se meio NYDA modificado sendo a glicose substituída por 1% (ZHAO et al., 2010; KUMAR, S. et al., 2012) ou 0,2% (ANTONY et al., 2012; GEBREYOHANNES, 2015)

(m/v) de amido (APÊNDICE) . Os isolados foram repicados para o meio de cultura e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72h para a concentração de 0,2% e 120h para a concentração de 1%. Após este período, as placas de Petri foram cobertas com solução de lugol, que forma um complexo azul escuro com o amido. As colônias que apresentaram halo claro foram consideradas produtoras de amilases (ZHAO et al., 2010).

4.6.6 Proteases

A produção de enzimas proteolíticas foi testada de acordo com Hynes e Tagg (1985) com algumas modificações. Leite desnatado na concentração de 1% (m/v) foi suplementado ao meio NYDAm e utilizado como substrato indicador de atividade proteolítica. Os isolados foram repicados para o meio de teste e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 72h. As colônias que apresentaram halo opaco (hidrólise parcial) e/ou transparente (hidrólise completa) foram consideradas produtoras de proteases.

4.6.7 Lacases

A capacidade de produção de lacases foi testada pela oxidação do composto incolor guaiacol (2-metoxifenol), com formação de composto de coloração avermelhada (VANTAMURI et al. 2015). Os testes foram realizados com dois meios de cultura diferentes. Além disso, para um dos meios, o guaiacol foi adicionado antes ou depois do meio ser autoclavado, caracterizando três testes diferentes (APÊNDICE). Os isolados foram repicados para o meio sólido e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por até sete dias. As colônias que formaram halo de coloração avermelhada foram consideradas positivas para a produção de lacases (VISWANATH et al., 2006).

4.6.8 Polifenoloxidasas

A atividade de polifenoloxidasas extracelular foi detectada pelo escurecimento oxidativo do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) (reação de Bavendamm) (BAVENDAMM, 1928) em meio de cultura sólido. Os isolados foram repicados para o meio de cultura sólido (APÊNDICE) e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 10 dias. As colônias que apresentaram halo escuro ao redor foram consideradas produtoras de polifenoloxidasas.

4.6.9 Tirosinases

A produção de tirosinases foi detectada por cultivo em meio Ágar-tirosina (APÊNDICE). Os isolados foram repicados para o meio de teste e incubados a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 17 dias. As enzimas do grupo das tirosinases têm tirosina como substrato e catalisam sua orto-hidroxilação e subsequente oxidação a orto-quinona com oxigênio molecular como aceptor final de elétrons. Em seguida, a quinona reage espontaneamente para produzir melaninas, que possuem coloração escura. Portanto, os isolados que apresentaram escurecimento do meio extracelular ou das colônias foram considerados produtores de tirosinases (DALFARD et al., 2006; RAVAL et al., 2012).

4.6.10 Lipases/esterases

A detecção de atividade lipolítica/esterásica foi realizada através da hidrólise do surfactante Tween 80, de acordo com Rajan et al. (2011) com uma modificação (a peptona do meio original foi substituída por extrato de carne). Os isolados foram repicados para o meio de teste (APÊNDICE) e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por cinco dias. As colônias que apresentaram halo de formação de cristais de oleato de cálcio, formado pela reação de ácido oleico (produto de hidrólise do Tween 80) na presença de íons cálcio, foram consideradas produtoras de lipases ou esterases.

4.6.11 DNases

A detecção de produção de DNases foi realizada através de cultivo em meio sólido contendo ácido desoxirribonucleico (DNA) (APÊNDICE). Os isolados foram repicados para o meio de teste e incubados a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 72h. Em seguida, as placas de Petri foram cobertas com solução de HCl 1 M até que o meio ficasse completamente opaco, indicando a precipitação do DNA, que é insolúvel em pH ácido. Entretanto, os produtos de hidrólise de DNA são solúveis em meio ácido. Portanto, as colônias que apresentaram halo transparente após a precipitação do DNA foram consideradas produtoras de DNases (JEFFRIES; GUSE, 1953).

4.6.12 Capacidade de crescimento e degradação de papel de filtro

Após avaliação de capacidade de produção de celulasas, alguns isolados positivos foram testados quanto à capacidade de crescer e degradar papel de filtro.

Este teste foi realizado com quatro meios diferentes (meios 1, 2, 3 e 4) (APÊNDICE) em dois testes diferentes (modificado de RAMIN et al., 2008).

4.6.12.1 Teste 1 para degradação de papel de filtro

Os isolados A3, A5, A7 e B9 foram repicados para tubos de ensaio de 25 mL contendo 10 mL de meio líquido e uma fita de papel de filtro 1cm X 4cm. Neste primeiro teste, os meios utilizados formam os meios 1 e 2. O repique foi feito por meio de 100 µL de suspensão do isolado em água destilada esterilizada, já o controle foi composto por adição de mesmo volume de água destilada esterilizada. Os tubos foram avaliados durante 41 dias quanto ao crescimento de colônias e estado do papel de filtro comparando-os ao controle.

4.6.12.2 Teste 2 para degradação de papel de filtro

Os isolados A3 e A5 foram repicados para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido + uma fita de papel de filtro 1cm X 8cm. Neste segundo teste, os meios utilizados formam os meios 3 e 4, além de meios controle positivo nos quais o papel de filtro foi substituído por 0,5% (m/v) de glicose. O repique foi feito por meio de 500 µL de suspensão do isolado em água destilada esterilizada, o controle negativo foi composto por adição do mesmo volume de água destilada esterilizada e o controle de crescimento, para comparação de crescimento dos isolados em meio com glicose em vez de papel de filtro, foi feito com os meios já descritos anteriormente. Os tubos foram avaliados durante 50 dias quanto ao crescimento de colônias e estado do papel de filtro comparando-os aos controles positivos e negativos.

4.6.13 Descoloração dos corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala

Alguns dos isolados que apresentaram atividade de polifenoloxidasas foram submetidos a testes de descoloração de corantes em meio sólido e em meio líquido.

4.6.13.1 Descoloração em meio sólido

Os isolados A5, B7, D1 (bactérias) e A7, E12 (leveduras) foram selecionados para os testes de descoloração dos corantes em meio sólido. O repique foi realizado em triplicata por deposição de 20 µL de suspensão em água destilada do crescimento microbiano em meio NYDAm com 48h de incubação (em B.O.D. a $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) na superfície de placas de Petri contendo meio de teste + corante

(APÊNDICE). As placas de Petri foram fechadas com papel de filme e incubadas em B.O.D ($32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) durante 12 dias. Índices de descoloração foram calculados dividindo-se o halo de descoloração pelo diâmetro da colônia.

4.6.13.2 Descoloração em meio líquido

A capacidade dos isolados A5, B7, D4 (bactérias) e B6, B8, C2 e E11 (leveduras) de descolorirem os corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala em meio líquido em pequena escala foi testada por incubação dos isolados em meio líquido (100 μL de NYD e M3+glicose) (APÊNDICE) contendo os respectivos corantes em placas de 96 micropoços. Os isolados foram transferidos em quadruplicata a partir de 10 μL de culturas líquidas em meio NYD com 72h de crescimento. Controles de crescimento (meio sem corante) e de descoloração abiótica (meio estéril com corante) foram realizados em quadruplicata substituindo-se a suspensão de microrganismo por meio de cultura. As placas de micropoços foram fechadas com papel filme e incubadas em B.O.D. a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, sendo realizada inspeção visual de descoloração a cada 24h por um período de 72h. A descoloração foi avaliada comparando-se visualmente a intensidade da coloração do meio com o controle negativo, tendo sido avaliados os poços com crescimento e o sobrenadante das culturas (modificado de KHAN; MATHUR, 2015).

4.7 Identificação dos Isolados por MALDI-TOF

A técnica de MALDI-TOF (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo, em português) tem sido cada vez mais usada para a identificação de microrganismos. A identificação se dá por comparação dos espectros de massa obtidos com um banco de dados, podendo se feita identificação a nível de espécie, dependendo da qualidade do espectro e do banco de dados. Os espectros são obtidos através da irradiação de um laser sobre a cultura pura recoberta por uma matriz orgânica, que é excitada pelo laser e ioniza as moléculas contidas na amostra. As moléculas ionizadas são puxadas por ação de um vácuo e sua massa é determinada pelo tempo de voo (TOF – “*time of light*”). Normalmente, as biomoléculas analisadas para a identificação de microrganismos são proteínas, especialmente as proteínas ribossomais (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013).

Para a identificação dos microrganismos, colônias com 48h a 10 dias de crescimento foram depositadas como filmes finos na placa de leitura do equipamento. As colônias foram recobertas com 1 μ L de solução de matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila/água/ácido trifluoroacético (50:47,5:2,5)). Após a matriz ter secado, o procedimento de leitura foi realizado.

Os espectros de íons positivos em modo linear foram obtidos espectrômetro de massas MALDI-TOF (Autoflex speed, Bruker Daltonik). Cada espectro foi composto de 2000 tiros de laser com massa selecionada de 2 a 20 kDa. Os espectros das amostras foram comparados aos do banco de dados do fabricante (Bruker Daltonik) e os resultados dados em forma de scores, sendo considerada identificação provável a nível de gênero os scores com valores de 1,700 a 1,999, identificação segura de gênero e provável de espécie os scores com valores de 2,000 a 2,99 e identificação altamente provável de espécie os scores com valores de 2,300 a 3,000 como sugerido pelo software utilizado pelo fabricante.

4.8 Análises Estatísticas

Os dados dos testes enzimáticos foram analisados utilizando-se o programa Assistat (versão 7.7). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias de no mínimo três replicatas comparadas pelo teste de Scott-Knott ou Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) quando os dados apresentaram distribuição normal e pelo teste de Kruskal-Wallis quando não.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Voláteis Emitidos pelas Cascas de Coco-verde em Fermentação

Os cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis gerados pelo processo de fermentação da casca do coco-verde nos dias 3, 5, 7 e 10 podem ser observados na Figura 7. Os valores de IRL foram calculados para todos os picos marcados e comparados com valores obtidos na literatura. Além disso, os espectros de massa obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST08, que sugeriu uma identidade correspondente a cada pico analisado. Estes dados podem ser observados na Tabela 1.

A partir da Tabela 1, pode-se observar que foram detectados 30 compostos, considerando-se todos os dias de fermentação analisados e que a área normalizada dos picos varia para a maioria dos compostos de acordo com o dia analisado. Os compostos 1-hexanol (a), 6-metil-3-octanona (i), 2-octanona (j), 2-pentilfurano (k), 2-octenal (o), 2-octen-1-ol (r) e 1-octanol (s) apresentam um perfil de diminuição da concentração ao longo dos dias de fermentação.

Os compostos heptanal (c) e nonanal (y) apresentam perfil de aumento da concentração ao longo dos dias de fermentação, sendo o último encontrado em maior concentração para todos os dias analisados. Os compostos restantes apresentaram pico de concentração no quinto ou sétimo dia, tais como a 2-heptanona (b) e o 2-octenal (p).

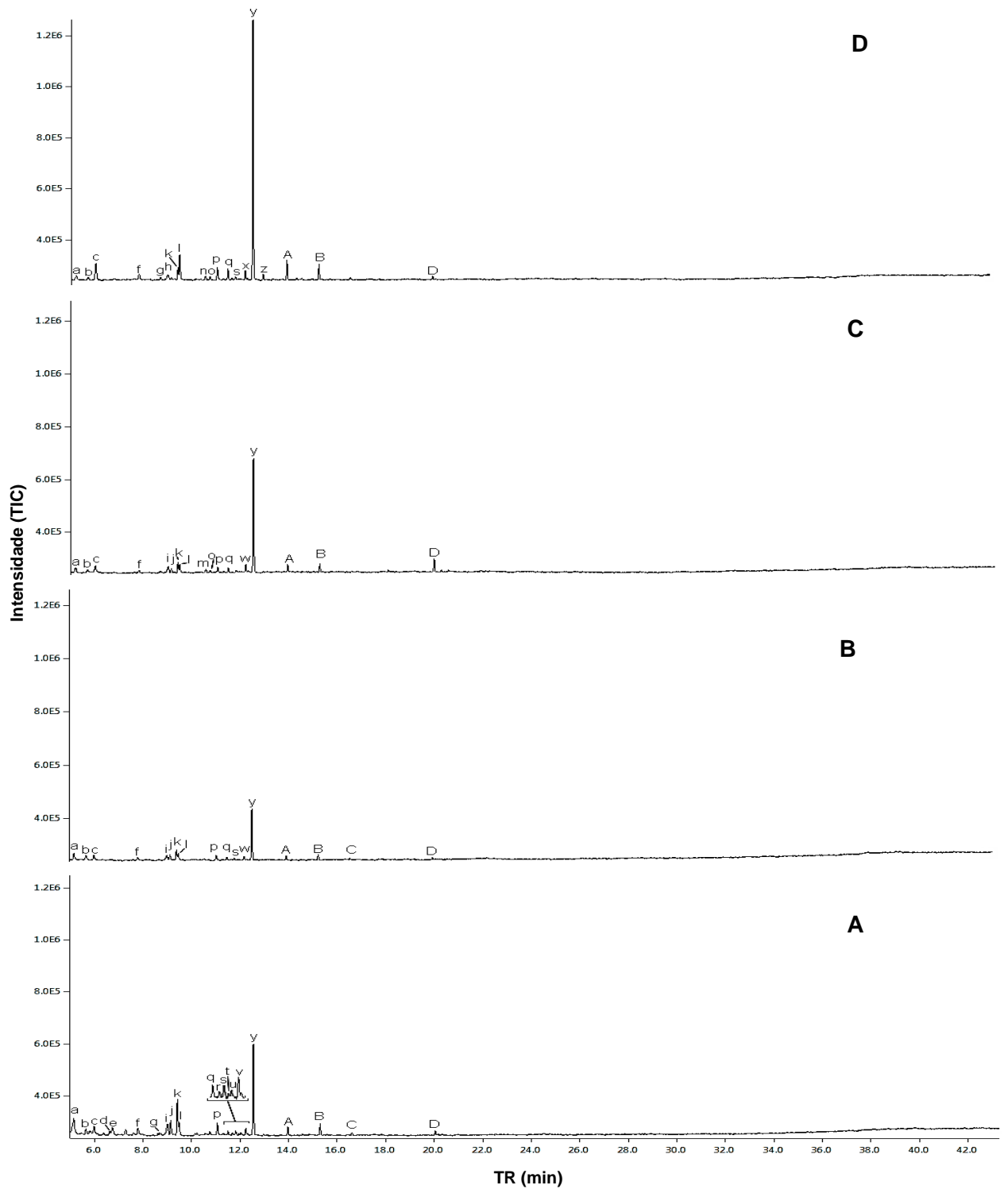
De acordo com Duarte (2015), o *R. palmarum* é atraído pelos odores liberados pela fermentação das cascas de coco-verde com maior intensidade no período entre os quinto e sétimo dias de fermentação, o que corresponde ao perfil de concentração encontrado para a 2-heptanona, composto atrativo para o mesmo inseto praga (ROCHAT et al., 2000), confirmando que existem compostos atrativos ao *R. palmarum* liberados pelo processo de fermentação da casca do coco-verde.

Os demais apresentaram comportamento não regular, sendo que alguns foram detectados apenas em um dos dias analisados ((propoximetil)-oxirano (d), 4-aliloxi-2-metil-pentan-2-ol (e), 1-octen-3-ona (g), 1-octen-3-ol (h), sabineno (m), hidrato de sabineno(n), 3,7-dimetil-undecano (t), 3-metilpent-2-en-1-ol (u), 2-octen-1-ol (z), 2-decenal (C) e sativeno (D)).

Ainda na Tabela 1, é possível observar a existência de dois picos com a mesma identidade sugerida para a substância correspondente (picos “o” e “p” para o

2-octenal e picos r e z para o 2-octen-1-ol). A identidade deve ser confirmada pela comparação com padrões bem com os IRL encontrados na literatura.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos para as análise dos voláteis coletados por aeração durante o período de fermentação das cascas de coco-verde nos dias 3 (A), 5 (B), 7(C) e 10 (D). As letras de a-z e A-D referem-se aos compostos tentativamente identificados listados na Tabela 1.

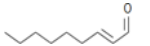
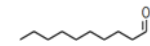
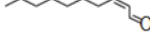



Fonte: o autor (2015)

Tabela 1 – Compostos tentativamente identificados por CG-EM e seus respectivos IRL calculados.

Pico	TR (min)	Composto ¹	Estrutura	IRL ²	IRL lit ³	Área normalizada dos picos			
						Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10
a	5,163	1-hexanol		854	860	9,06	5,32	3,69	1,78
b	5,662	2-heptanona*		869	865	2,75	5,22	1,64	1,04
c	5,995	Heptanal*		879	881	3,15	4,78	4,26	4,99
d	6,626	(propoximetil)-oxirano		898	NE ⁴	0,42	-	-	-
e	6,738	4-aliloxi-2-metil-pentan-2-ol		901	NE	3,37	-	-	-
f	7,807	2-heptenal*		932	929 (E) 931 (Z)	1,48	2,87	1,07	1,52
g	8,685	1-octen-3-ona*		958	961	0,88	-	-	0,56
h	9,004	1-octen-3-ol*		968	968	-	-	-	2,18
i	9,018	6-metil-3-heptanona		968	NE	6,38	5,3	4,01	-
j	9,138	2-octanona*		972	968	5,62	4,21	1,67	-
k	9,419	2-pentilfurano*		980	977	10,92	8,08	4,91	2,71
l	9,494	octanal*		982	983	1,89	4,71	3,98	6,53
m	10,578	sabineno		1016	996	-	-	1,45	-
n	10,576	hidrato de sabineno		1016	1073	-	-	-	0,78
o	10,760	2-octenal		1022	1030 (E) 1043 (Z)	-	-	1,36	0,9
p	11,069	2-octenal*		1032	1030 (E) 1043 (Z)	3,66	5,6	2,34	3,48
q	11,505	1-clorooctano*		1047	1043	1,38	2,79	1,87	2,62
r	11,677	2-octen-1-ol*		1053	1052 (E) 1039 (Z)	0,81	-	-	-
s	11,818	1-octanol*		1058	1059	1,71	1,35	-	0,65
t	11,950	3,7-dimetil-undecano		1062	NE	0,48	-	-	-
u	12,040	3-metilpent-2-en-1-ol		1065	NE	0,69	-	-	-
v	12,235	2-metil-10-undecenal		1072	NE	2,44	-	-	-
w	12,235	(E)-2-nonenal		1072	1136	-	2,97	3,25	-
x	12,235	(E)-4-nonenal*		1072	1071	-	-	-	1,97
y	12,549	nonanal*		1083	1084	32,95	37,49	52,33	58,75
z	12,973	2-octen-1-ol		1097	1052 (E) 1039 (Z)	-	-	-	1,15

Tabela 1 - Continuação...

A	13,971	nonenal*		1134	1134 (E) 1131 (Z)	2,87	2,6	3,06	4,31
B	15,304	n-decanal*		1184	1189	4,3	4,46	3,32	3,29
C	16,617	2-decenal*		1236	1234 (E) 1229 (Z)	1,07	0,72	-	-
D	20,046	sativeno		1383	1392	1,72	1,53	5,79	0,74

1- Composto sugerido com maior similaridade entre os espectros de massa contidos no banco de dados da biblioteca NIST08;
2- IRL calculado para coluna com fase estacionário DB-1 com base no padrão de alcanos lineares;

3-Índices de retenção linear (DB-1) disponível no endereço online do Instituto Nacional de Padrões e Tecnológica (National Institute of Standards and Technology, biblioteca versão NIST08) para o composto sugerido, disponível em "<http://webbook.nist.gov/chemistry/>";

4- IRL não encontrado.

* IRL calculado corresponde ao IRL do composto autêntico descrito na literatura (± 5 unidades)

Fonte: o autor (2016)

A partir dos dados contidos na Tabela 1, é possível observar variabilidade nas classes químicas detectadas pelo espectrômetro de massas. Foram detectados álcoois, cetonas e aldeídos, tanto saturados quanto insaturados, epóxidos, éteres de cadeia aberta, heteroaromáticos, hidrocarbonetos de cadeia aberta ramificada, terpenos, terpenóides e organoclorados. Além disso, pode-se perceber que a maioria das moléculas encontradas possui ao menos um átomo de oxigênio em sua estrutura.

Dos 30 compostos tentativamente identificados na Tabela 1, dezenove foram relatados na literatura como sendo produzidos por bactérias e/ou fungos (Tabela 2) (MATYSIK; HERBARTH, 2009; LEMFACK et al., 2013; HOLIGHAUS et al., 2014; ZOU et al., 2010; KANCHISWAMY; MALVOY; MAFFEI, 2015).

Tabela 2 – Relação descrita na literatura entre espécies de microrganismos e os voláteis emitidos pelo processo de fermentação da casca de coco-verde.

Composto	Bactérias	Referências	Fungos	Referências
1-hexanol (a)*	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Bacillus cereus</i> <i>Cellulomonas uda</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Burkholderia</i> spp.	1	<i>Armillaria mellea</i> <i>Pholiota squarrosa</i> <i>Verticillium longisporum</i> <i>Stropharia rugosoannulata</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium glabrum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Trichodema pseudokoningii</i>	1
	<i>Serratia proteamaculans</i>		<i>Ceratocystis</i> sp. <i>Thielaviopsis basicola</i> <i>Penicillium</i> sp.	
2-heptanona (b)	<i>Serratia marcescens</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Cyanobacteria</i>	1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	2

Tabela 2 – continuação...

heptanal (c)	-	-	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Tuber mesentericum</i> <i>Tuber aestivum</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	1
2-heptenal (f)	-	-	<i>Tuber aestivum</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	1
1-octen-3-ona (g)	<i>Phormidium</i> sp. <i>Rivularia</i> sp. <i>Calothrix parietina</i>	1	<i>Tuber melanosporum</i> <i>Tuber aestivum</i>	1
1-octen-3-ol (h)	-	-	<i>Fomes fomentarius</i>	3
2-octanona (j)	<i>Phormidium</i> sp. <i>Rivularia</i> sp.	1	<i>Trichoderma viride</i> <i>Aspergillus flavus</i>	1
2-octanona (j)	<i>Calothrix parietina</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>Vesicatoria</i> <i>Collimonas fungivorans</i>	1	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Tuber aestivum</i>	1
2-pentilfurano (k)	<i>Bacillus megaterium</i>	4	<i>Muscodor</i> sp.	5
octanal (l)	<i>Calothrix parietina</i> <i>Calothrix</i> sp. <i>Plectonema notatum</i> <i>Plectonema</i> sp. <i>Phormidium</i> sp. <i>Tolypothrix distorta</i> <i>Rivularia</i> sp.	1	<i>Tuber aestivum</i> <i>Trichoderma viride</i>	1
sabineno (m)	-	-	<i>Tuber magnatum</i> <i>Phomopsis</i> sp.	5
2-octenal (p)	-	-	<i>Tuber melanosporum</i> <i>Tuber indicum</i> <i>Tuber borchii</i>	5
2-octen-1-ol (r)	<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	1	<i>Tuber indicum</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Tuber uncinatum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	1
1-octanol (s)	<i>Serratia plymuthica</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	1	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Tuber indicum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	1

Tabela 2 – continuação...

nonanal (y)	<i>Chondromyces crocatus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas corrugate</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Pseudomonas aurantiaca</i> <i>Plectonema dotatum</i> <i>Tolypothrix Distorta</i>	1	<i>Tuber aestivum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Tuber melanosporum</i> <i>Penicillium paneum</i>	1
n-decanal (B)	<i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i> <i>Microbacterium oxydans</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Streptomyces lateritius</i> <i>Serratia arcescens</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Calothrix parietina</i> <i>Calothrix sp.</i> <i>Plectonema notatum</i>	1	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Tuber aestivum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Penicillium paneum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Trichoderma viride</i>	1
n-decanal (B)	<i>Plectonema sp.</i> <i>Phormidium sp.</i> <i>Tolypothrix distorta</i> <i>Rivularia sp.</i> <i>Burkholderia hospita</i>	1	<i>Trichoderma Pseudokoningii</i>	1
2-decenal (C)	<i>Phormidium sp.</i> <i>Rivularia sp.</i> <i>Calothrix parietina</i>	1	-	-
sativeno (D)	-	-	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Cochliobolus sativus</i> <i>Cladosporium cladosporioide</i>	5

*Referências: 1 - LEMFACK et al. (2013), 2 - MATYSIK; HERBARTH (2009), 3 - HOLIGHAUS et al. (2014), 4 - ZOU et al. (2010), 5 - KANCHISWAMY; MALVOY; MAFFEI (2015). Os compostos não apresentados na tabela não foram encontrados sendo produzido por microrganismos. * As letras entre parênteses se referem aos picos identificados na Tabela 1.

Fonte: o autor (2016)

De acordo com a literatura, alguns dos compostos listados na Tabela 1 possuem atividade biológica comprovada. Por exemplo, 1-hexanol (BLOM et al., 2011) e 2-pentilfurano (ZOU et al., 2010) apresentam propriedades de promoção de crescimento de plantas. 1-octen-3-ol, emitido pelo fungo *Fomes fomentarius*, atua como repelente do besouro fungívoro *Bolitophagus reticulatus* (Coleoptera: tenebrionidae) (HOLIGHAUS et al., 2014) e na indução de defesa e proteção da planta *Arabidopsis thaliana* contra o fungo *Botrytis cinerea* (KISHIMOTO et al., 2007), enquanto que trans-2-octenal apresenta efeito inibitório no desenvolvimento desta mesma espécie de planta (SPLIVALLO et al., 2007).

Muito dos compostos listados na Tabela 1 (1-hexanol, 2-heptanona, heptanal, 2-heptenal, 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, octanal, 2-octenal, 2-octanona, 2-octen-1-ol, 1-octanol, 2-nonenal, nonanal, n-decanal e 2-decenal) são produtos do metabolismo

de ácidos graxos saturados e insaturados (WEISE et al., 2012; AKHTAR; TURNER; JONES, 2013; KAISER et al., 2013).

A biossíntese de 2-heptanona e 2-octanona ocorre pela descarboxilação dos ácidos 3-oxooctanoico e 3-oxononanoico, respectivamente. Estes são intermediários na β -oxidação de ácidos graxos de número par e ímpar de carbonos, na devida ordem (WEISE et al., 2012).

Os aldeídos heptanal, octanal, nonanal e decanal podem ser formados pela redução enzimática dos análogos ácidos, também intermediários nas vias da β -oxidação ou de síntese de ácidos graxos; já os álcoois 1-hexanol, 1-octen-3-ol, 1-octanol e 2-octen-1-ol são formados pela redução dos aldeídos correspondentes através da enzima álcool desidrogenase (AKHTAR; TURNER; JONES, 2013; KAISER et al., 2013).

Compostos derivados da peroxidação lipídica do ácido linoleico (ácido 9,12-ocradecadienoico) também foram detectados. Destes, podem ser citados 1-octen-3-ol, 2-octenal, 1-octen-3-ona e 2-pentilfurano, metabólitos geralmente associados a fungos (COMBET et al., 2006; HEDDERGOTT; CALVO; LATGÉ, 2013). Estas observações sugerem o envolvimento de microrganismos com metabolismo oxidativo na produção da maioria dos voláteis.

Entretanto, a presença de compostos associados ao metabolismo fermentativo [etanol (IRL=440), etanal (IRL=359), ácido acético (IRL=625), acetato de etila (IRL=601), ácido láctico (IRL=838), 2,3-butanodiol (IRL=747,5) e acetoína (IRL=678)] não pode ser descartada, visto que os analitos que eluíram antes dos 5 min de análise não foram detectados devido ao corte do solvente, o que significa que os compostos com IRL<854, correspondente ao primeiro composto detectado (1-hexanol) não poderiam ser observados. Este é o caso para os compostos voláteis citados anteriormente.

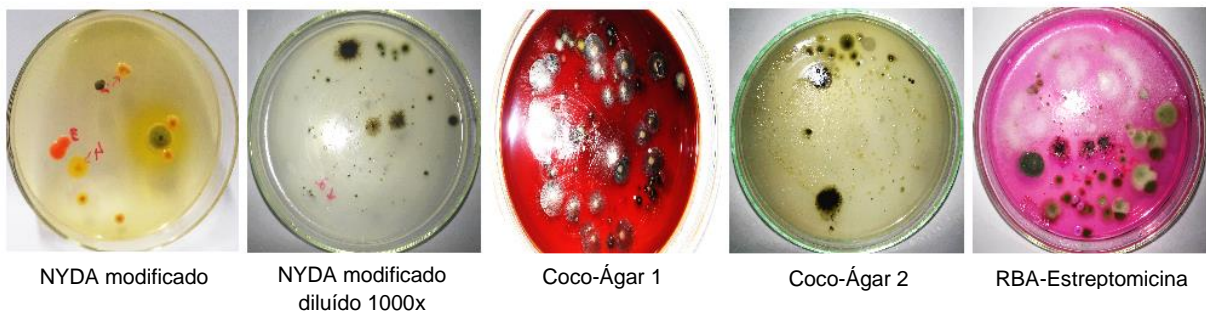
5.2 Isolamento e Purificação dos Microrganismos

As bactérias e leveduras obtidas neste trabalho foram isoladas em cinco meios de cultura diferentes. Foram realizados dois procedimentos de isolamento, um imediatamente após a abertura dos cocos-verdes e o outro no sexto dia de fermentação. O primeiro não resultou no crescimento de nenhuma colônia em nenhum dos meios de cultura usados, o que indica baixa incidência de

microrganismos presentes nos tecidos do coco antes de sua abertura e que aqueles isolados no sexto dia são ambientais e não endofíticos.

O segundo isolamento, realizado ao sexto dia de fermentação, possibilitou a obtenção inicial de 49 isolados (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). Exemplos do crescimento observado nas placas de Petri após 12 dias de incubação podem ser vistos na Figura 8.

Figura 8 – Placas de Petri com os cinco meios diferentes de isolamento após 12 dias de incubação a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.



Fonte: o autor (2016)

Dentre os isolados obtidos, apenas as bactérias e leveduras foram selecionadas para a continuidade do trabalho, sendo que o número de culturas viáveis decresceu com o tempo, culminando na caracterização de 38 isolados, sendo 23 linhagens de leveduras e 15 linhagens bacterianas (Tabela 3).

Como pode ser observado na Tabela 3, dois dos cinco meios de cultura utilizados possibilitaram o isolamento de apenas leveduras. Estes meios são CA1 e RBA-estreptomicina. Este último foi selecionado para ser utilizado por ser ideal para o isolamento de fungos e leveduras sem contaminação bacteriana, o que corrobora com os resultados de isolamento obtidos para este meio. Já o meio CA1 foi preparado a partir de extrato aquoso do mesocarpo da casca de coco-verde. De acordo com a literatura, extratos orgânicos e aquosos das fibras da casca do coco possuem atividade antibacteriana e antifúngica, sendo taninos, catequinas e outros compostos relacionados a esta atividade (LIMA et al., 2015). Portanto, é possível que determinados compostos presentes no extrato aquoso utilizado para a preparação do meio apresentem atividade antibacteriana mesmo após a esterilização em autoclave (120°C durante 20 minutos).

Tabela 3 – Isolados obtidos relacionados por meio de cultura e matriz de isolamento.

Código	Microrganismo	Casca do coco*	Parte do coco	Meio de cultura
A1	Bactéria	1	Interior	NYDAm
A2	Bactéria	1	Interior	NYDAm
A3	Bactéria	1	Interior	NYDAm
A5	Bactéria	1	Superfície	NYDAm
A6	Levedura	2	Interior	NYDAm
A7	Levedura	3	Interior	NYDAm
A8	Bactéria	3	Interior	NYDAm
B1	Bactéria	1	Interior	NYDAm/1000
B2	Bactéria	1	Interior	NYDAm/1000
B3	Bactéria	1	Interior	NYDAm/1000
B4	Levedura	1	Interior	NYDAm/1000
B6	Levedura	1	Superfície	NYDAm/1000
B7	Bactéria	1	Superfície	NYDAm/1000
B8	Levedura	2	Interior	NYDAm/1000
B9	Bactéria	2	Interior	NYDAm/1000
B10	Levedura	3	Interior	NYDAm/1000
B11	Bactéria	3	Interior	NYDAm/1000
C1	Levedura	1	Interior	CA1
C2	Levedura	1	Interior	CA1
C5	Levedura	1	Superfície	CA1
C6	Levedura	2	Interior	CA1
C7	Levedura	2	Interior	CA1
C10	Levedura	3	Interior	CA1
D1	Bactéria	1	Superfície	CA2
D2	Bactéria	1	Superfície	CA2
D3	Levedura	2	Interior	CA2
D4	Bactéria	2	Interior	CA2
D5	Levedura	3	Interior	CA2
D6	Bactéria	3	Interior	CA2
E1	Levedura	1	Interior	RBA-Estreptomicina
E2	Levedura	1	Interior	RBA-Estreptomicina
E4	Levedura	1	Superfície	RBA-Estreptomicina
E7	Levedura	2	Interior	RBA-Estreptomicina
E9	Levedura	2	Interior	RBA-Estreptomicina
E10	Levedura	3	Interior	RBA-Estreptomicina
E11	Levedura	3	Interior	RBA-Estreptomicina
E12	Levedura	3	Interior	RBA-Estreptomicina
E13	Levedura	3	Interior	RBA-Estreptomicina

*NYDAm: NYDA modificado; NYDAm/1000: NYDA modificado diluído 1000 vezes; CA1: Coco-Ágar 1; CA2: Coco-Ágar2; RBA-Estreptomicina.: Rosa bengala-Ágar-Estreptomicina. *Casca utilizada no isolamento (ver item 4.4)

Fonte: o autor (2015)

5.3 Caracterização dos Microrganismos Isolados

5.3.1 Morfologia das colônias e morfologia celular

Como parte do processo de caracterização das bactérias e leveduras isoladas, as características morfológicas principais das colônias crescidas em meio NYDAm por 24h e $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e as morfologias celulares foram examinadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Características morfológicas dos isolados crescidos em meio NYDA modificado.

Isolado	Morfologia		Gram	Cor	Borda	Elevação	Tamanho	Propriedade ótica
	Colônia	Células						
A1	Circular	Bacilos	-	Esbranquiçada	Inteira	ND	Mediano	Translúcida
A2	Circular	Cocos	-	Amarelada	Irregular	Umbonada	Mediano	Translúcida
A3	Circular	Bacilos	-	Esbranquiçada	Inteira	ND	Mediano	Translúcida
A5	Circular	Filamentosa	+	Creme	Irregular	ND	Mediano	Opaca
A6	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	Convexa	Mediano	Opaca
A7	Circular	Oval	ND	Alaranjada	Inteira	ND	Pequeno	Opaca
A8	Circular	Bacilos	-	Esbranquiçada	Inteira	ND	Puntiforme	Translúcida
B1	Irregular	Bacilos	-	Amarelada	Irregular	ND	Grande	Translúcida
B2	Circular	Bacilos	+	Amarela	Inteira	Umbonada	Grande	Translúcida
B3	Irregular	Bacilos	+	Amarelada	Irregular	ND	Grande	Translúcida
B4	Circular	Oval	ND	Branca	Filamentosa	ND	Mediano	Opaca
B6	Circular	Oval	ND	Branca	Regular	Pulvinada	Grande	Opaca
B7	Circular	Irregular	+	Rósea	Regular	ND	Puntiforme	Translúcida
B8	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	Umbonada	Mediano	Opaca
B9	Circular	Oval	ND	Amarela	Inteira	ND	Grande	Translúcida
B10	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	Umbonada	Grande	Opaca
B11	Circular	Bacilos	+	Amarelada	Inteira	ND	Pequena	Translúcida
C1	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	Umbonada	Grande	Opaca
C2	Circular	Oval	ND	Creme	Filamentosa	Umbonada	Grande	Opaca
C5	Circular	Cilíndrica	ND	Alaranjada	Inteira	Umbonada	Mediano	Opaca
C6	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
C7	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	Umbonada	Mediano	Opaca
C10	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	Umbonada	Mediano	Opaca
D1	Circular	Bacilos	+	Creme	Irregular	ND	Grande	Translúcida
D2	Circular	Irregular	+	Rósea	Inteira	Convexa	Pequeno	Opaca
D3	Circular	Oval	ND	Esbranquiçada	Inteira	Umbonada	Grande	Opaca
D4	Circular	Cocos	-	Amarelada	Inteira	Umbonada	Grande	Translúcida
D5	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
D6	Circular	Bacilos	-	Creme	Inteira	ND	Mediano	Translúcida

Tabela 4 – continuação...

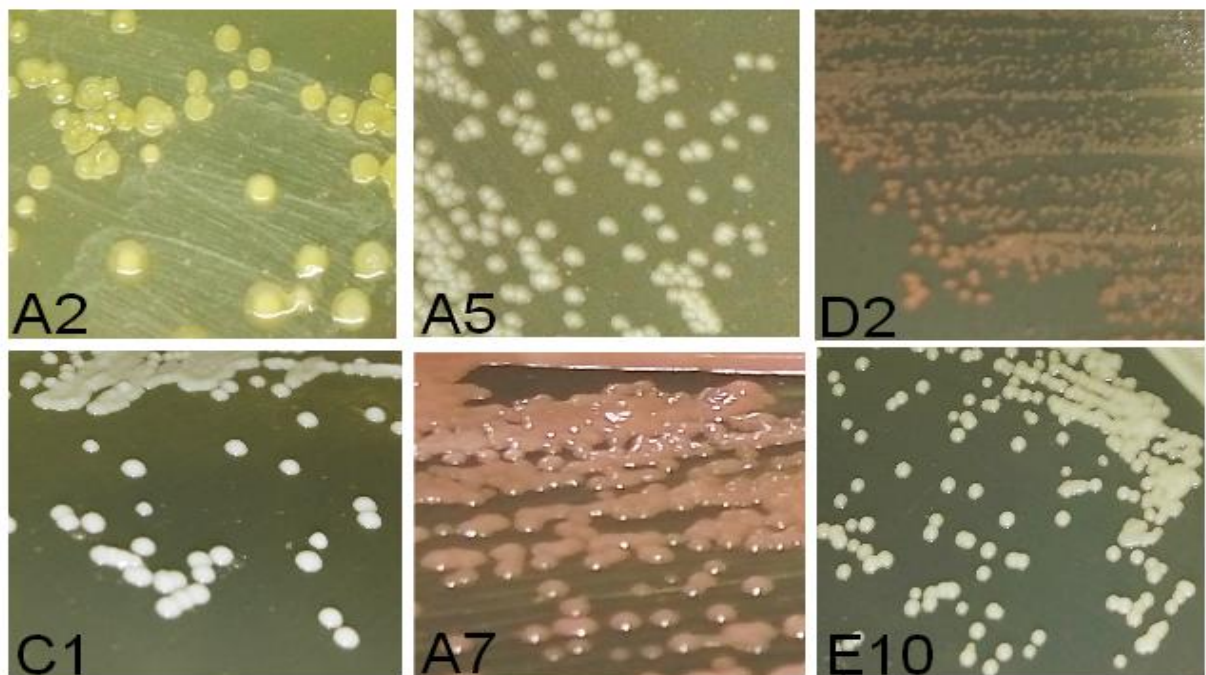
E1	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
E2	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
E4	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	ND	Grande	Opaca
E7	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
E9	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca
E10	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	ND	Grande	Opaca
E11	Circular	Oval	ND	Creme	Inteira	ND	Grande	Opaca
E12	Circular	Oval	ND	Alaranjada	Inteira	ND	Grande	Opaca
E13	Circular	Oval	ND	Branca	Inteira	ND	Grande	Opaca

ND – Não determinado

Fonte: o autor (2015)

Todas as leveduras apresentaram colônias circulares, grandes, opacas e de coloração variada, sendo a maioria branca e creme. Colônias de coloração alaranjada também foram observadas. Já os isolados bacterianos apresentaram maior diversidade morfológica, com colônias variando desde puntiformes a grandes, com forma geral circular, translúcidas (exceto para o isolado A5) e pigmentação amarelada, esbranquiçada, rósea ou creme. Algumas destas características podem ser observadas na Figura 9.

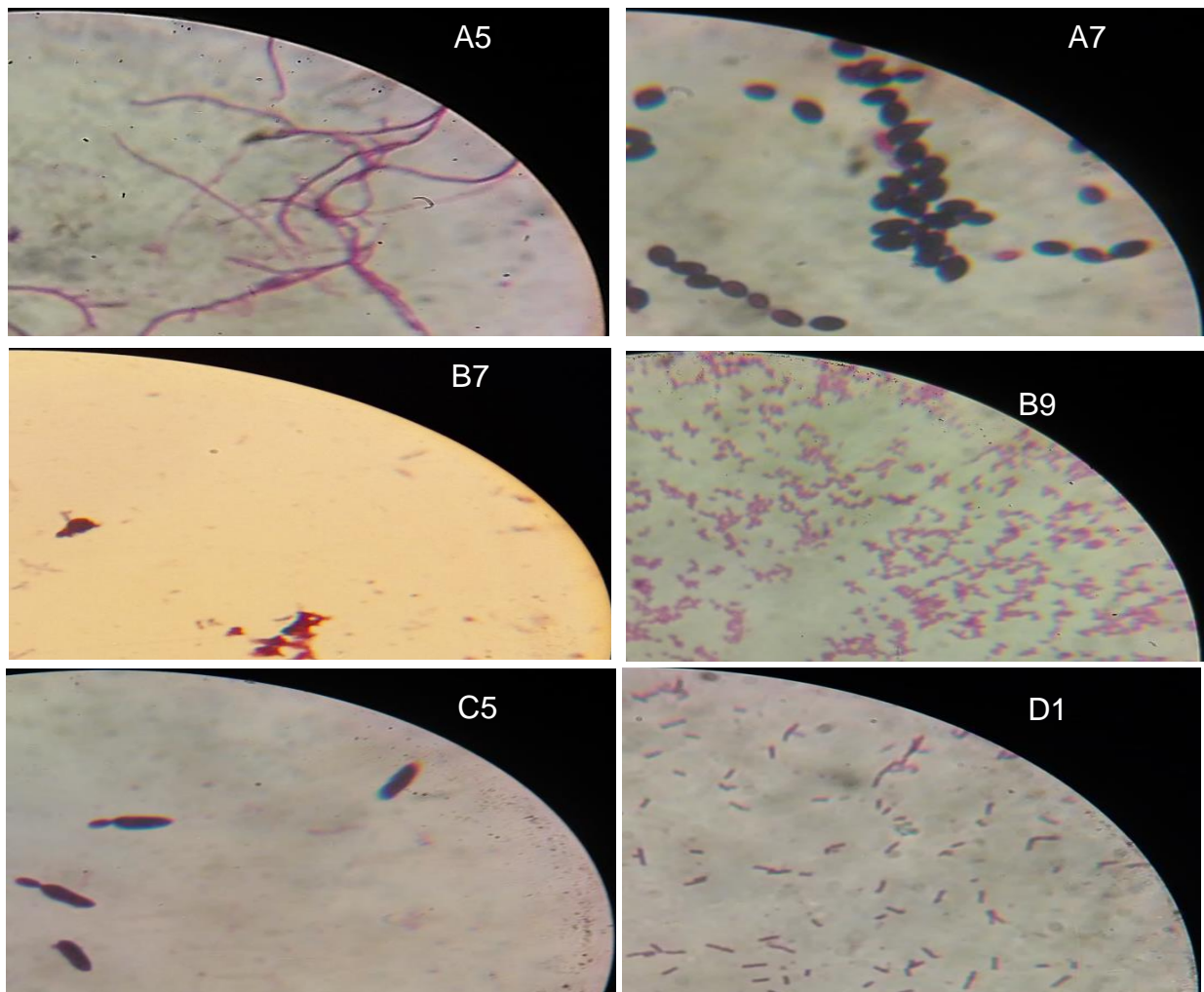
Figura 9 - Características morfológicas das colônias das bactérias A2, A5 e D2 e das leveduras C1, A7 e E10 crescidas em meio NYDA modificado durante 48h.



Fonte: o autor (2017)

A morfologia celular dos isolados foi determinada por exame em microscópio de esfregaços submetidos à coloração de Gram (Tabela 4). Os isolados bacterianos apresentaram morfologia diversificada tais como bacilos, cocos, filamentos e irregular. Os isolados de leveduras mostraram menor variabilidade morfológica, apresentando células de morfologia oval e uma com morfologia cilíndrica. Todas as leveduras apresentaram brotamento. Exemplos das morfologias celulares dos isolados podem ser observados na Figura 10.

Figura 10 - Morfologia celular de alguns isolados representativos. A5, B7, B9 e D1 são bactérias, enquanto que C5 e A7 são leveduras. Magnificação de 1600x.



Fonte: o autor (2016)

5.3.2 Características bioquímicas e fisiológicas dos isolados

Algumas características fisiológicas e bioquímicas foram testadas para os microrganismos isolados a fim de se obter conhecimento mais aprofundado sobre os

isolados e uma melhor caracterização dos mesmos. Uma das características estudadas foi a capacidade de os isolados crescerem em meio de cultura hipersalino, o que é indicativo de halotolerância. Os resultados de crescimento nos meios com NaCl foram comparados a um controle (meio NYDA modificado sem NaCl) e apenas os isolados que apresentaram crescimento no controle foram considerados. Estes resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Crescimento dos isolados em meio com diferentes concentrações de NaCl (5%, 10% e 15% m/v).

Bactérias	5% de NaCl			10% de NaCl			15% de NaCl		
	2 Dias	5 Dias	7 dias	2 Dias	5 Dias	7 dias	2 Dias	5 Dias	7 dias
A1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A5	±	+	+	-	-	-	-	-	-
A8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B11	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D1	+	+	+	±	+	+	-	-	-
D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D4	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Leveduras									
A6	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A7	+	+	+	+	+	+	±	±	±
B4	+	+	+	+	+	+	-	+	+
B6	+	+	+	+	+	+	-	-	±
B8	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B10	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C2	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C5	+	+	+	+	+	+	±	+	+
C6	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C7	+	+	+	+	+	+	-	±	±
C10	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D3	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D5	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Tabela 5 – continuação...

E1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E2	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E4	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E7	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E9	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E10	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E11	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E12	+	+	+	±	±	±	-	-	-
E13	+	+	+	+	+	+	-	±	+

+: crescimento bom; -: crescimento não detectado; ±: pouco crescimento detectado; ND: não determinado

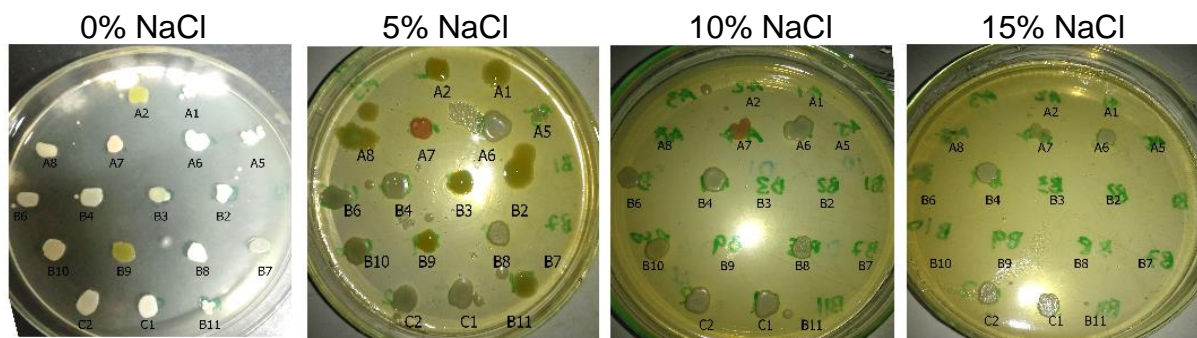
Fonte: o autor (2016)

Ao total, foram testados 36 isolados quanto à halotolerância. Destes, 34 (11 bactéria e 23 leveduras) cresceram em meio com 5% (m/v) de NaCl, 24 (1 bactéria e 23 leveduras) cresceram em meio com 10 % (m/v) de NaCl e 17 (apenas leveduras) cresceram em meio com 15% (m/v) de NaCl.

Pode-se perceber que o aumento na concentração de NaCl tem efeito negativo na velocidade e capacidade de crescimento de alguns dos isolados, principalmente dos bacterianos (Figura 11), visto que apenas um conseguiu crescer na concentração de 10% durante o intervalo de tempo de avaliação de crescimento. Os isolados D2 e B7 foram os únicos incapazes de crescer a 5% de NaCl.

As leveduras, por outro lado, se mostraram mais bem adaptadas a altas concentrações de cloreto de sódio, pois todas cresceram a 10% e 17 a 15% de NaCl. Os isolados que se mostraram mais resistentes ao aumento na concentração de NaCl foram A7 e C5, que exibiram crescimento visível com 48h de incubação.

Figura 11- Efeito do aumento da concentração de NaCl no crescimento dos isolados após sete dias de incubação a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.



Fonte: o autor (2016)

Um microrganismo é dito halotolerante se possui a capacidade de crescer em meio com maiores concentrações de sal que a necessária para o crescimento. Aqueles cujo limite de concentração de sal em que conseguem sobreviver excede 2,5M de NaCl podem ser classificados como extremamente halotolerantes (OREN, 2006). Portanto, todos os microrganismos que cresceram a 5% de NaCl ou mais podem ser classificados como halotolerantes, sendo que os 17 isolados de leveduras capazes de crescer a 15% de NaCl (aproximadamente 2,57 M) podem ser considerados extremamente halotolerantes.

Uma possível explicação para a alta incidência de microrganismos halotolerantes é a origem de isolamento (KUMAR et al., 2010; JAOUANI et al., 2014). Os microrganismos foram isolados da casca do coco-verde no sexto dia de fermentação. No momento do isolamento, o aspecto seco e menor peso ao serem carregadas indicam que as cascas haviam perdido quantidade considerável de água. Portanto, aqueles capazes de tolerar ambientes com baixa atividade de água seriam mais aptos a crescer neste substrato específico. A halotolerância pode ser relacionada a este fato, pois microrganismos halotolerantes podem crescer em ambientes com baixa atividade de água em razão da maior quantidade de sal dissolvida.

Uma destas estratégias adotadas pelos microrganismos para a sobrevivência em meio hipersalino consiste no aumento da concentração intracelular de íons inorgânicos, diminuindo ou eliminando a diferença entre as concentrações intracelular e extracelular. Neste caso, a maquinaria responsável pela atividade metabólica deve ser funcional a altas concentrações de sal (OREN, 2006). Por este motivo, certos microrganismos halotolerantes possuem capacidade de produzir enzimas ativas em condições extremas de salinidade (SETATI, 2010).

Kumar et al. (2010) isolaram uma linhagem extremamente halotolerante e levemente halofílica da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (cepa AK5) e constataram que esta linhagem possui a capacidade de produzir esterase, asparaginase e glutaminase halotolerantes.

Jaouani et al. (2014) isolaram 21 linhagens de fungos levemente halotolerantes de Sebkha El Melah, um deserto de sal saariano do sul da Tunísia, e constataram que 13 destes isolados (cinco *Penicillium* spp., quatro *Cladosporium* spp., *Aspergillus favus* JA4, duas *Alternaria* spp. e *Engyodontium album* JA7) produziram altas quantidades de pelo menos uma das enzimas testadas (amilases,

carboximetilcelulase, lacases, proteases e lipases) em meio com 10% de NaCl, demonstrando o potencial biotecnológico destas linhagens. Tais resultados indicam a importância de se testar a produção de enzimas extracelulares sob diferentes concentrações de NaCl, revelando a possibilidade de produção de enzimas halotolerantes pelos isolados obtidos no presente trabalho, com maior destaque para as leveduras.

5.3.3 Produção de ácido a partir de carboidratos e outros compostos

A capacidade de produção de ácidos a partir de certo composto, principalmente carboidratos é uma das características utilizadas para diferenciação dos microrganismos. Tendo este objetivo em vista, foi determinada a capacidade fermentação de dextrose, sacarose, maltose e manitol. Além disso, foi testado o crescimento em meio Manitol-sal-ágar (MSA) e capacidade de hidrolisar tirosina. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de ácidos a partir da fermentação de diversos compostos, crescimento em meio MSA e hidrólise de tirosina.

Bactérias	Ácido de:				Crescimento em meio MSA	Hidrólise de tirosina
	Glicose	Sacarose	Maltose	Manitol		
A2	-	-	-	-	C±	-
A3	±	±	+	-	C±	-
A5	-	-	-	-	NC	+
B7	-	-	-	-	CP-	-
B9	-	-	-	-	C+	-
D1	-	-	-	-	C+	-
D2	-	-	-	-	NC	-
D4	-	-	-	-	C+	-
D6	+	+	+	+	C±	-
Leveduras						
A6	±	+	-	-	C±	-
A7	+	+	-	-	C-	+
B4	±	±	-	-	C±	-
B6	±	+	-	-	C±	-
B8	+	+	+	-	CP-	-
B10	+	+	+	-	C-	-
C1	+	+	+	+	C+	-
C2	+	+	+	+	C+	-
C6	+	+	+	+	ND	-
C7	±	+	-	-	C+	-

Tabela 6 – continuação...

C10	±	+	-	-	C+	-
D3	+	+	-	+	C+	-
D5	-	-	-	-	C±	-
E1	+	+	-	-	C±	-
E2	-	-	-	-	C±	-
E4	-	-	-	-	C±	-
E7	+	+	+	-	C±	ND
E10	+	+	+	-	CP-	+
E11	+	+	+	-	CP-	-
E12	+	+	-	-	C-	++
E13	+	+	+	-	C+	-

+: reação positiva; ++: reação positiva com alta atividade; -: reação negativa; ±: reação fraca positiva; C+: cresceu com reação positiva; C-: cresceu com reação negativa; CP-: cresceu pouco com reação negativa; NC: não cresceu; ND: não determinado.
Fonte: o autor (2016)

Os isolados A1, A8, B1, B2, B3 e B11 não apresentaram crescimento, por isso foram omitidos da Tabela 6. A maioria das bactérias testadas foi incapaz de fermentar dextrose, sacarose, maltose e manitol (A2, A5, B7, B9, D1, D2, D4). Entretanto, foi observado que um número maior de isolados bacterianos foi capaz de fermentar o manitol contido no meio MSA. Dentre estes, estão os isolados A2, A3, B9, D1 e D4, que não apresentaram reação ácida no meio sem NaCl. Apenas o isolado D6 foi capaz de fermentar todos os compostos testados, enquanto que o isolado A3 fermentou dextrose, maltose e sacarose.

O perfil de fermentação dos substratos testados foi mais diverso para as leveduras. Os isolados A6, A7, B4, B6, C7, C10, E1, E12 apresentaram reação ácida apenas com dextrose e sacarose, enquanto que B8, B10, E7, E10, E11, E13 foram positivos para dextrose, sacarose e maltose; já o isolado D3 apresentou reação positiva para dextrose, sacarose e manitol, enquanto que C1, C2 e C6 fermentaram todos os substratos utilizados. Os isolados D5, E2 e E4 não foram capazes de fermentar nenhum dos substratos testados.

A produção de ácido a partir de manitol também foi diferenciada entre o meio usado de fermentação e o meio MSA. Exemplos são os isolados A6, B4, B6, C7, C10, D5, E1, E2, E4, E7 e E13, que fermentaram manitol em meio manitol-sal-ágar, mas não em meio de fermentação de manitol sem adição de NaCl.

Uma possível razão para a diferença entre reações de fermentação de manitol em meio com e meio sem NaCl é a diferença na concentração de manitol.

Enquanto que no meio de fermentação sem NaCl a concentração é de 5 g/L, no meio MSA esta é de 10 g/L. É possível que tal diferença torne a fermentação do poliálcool mais lenta e, por consequência, com menor produção de ácido no mesmo intervalo de tempo, não havendo a detecção de diminuição no pH.

Outra possível explicação seria o efeito do sal no metabolismo dos isolados, visto que microrganismos fazem uso de diferentes estratégias para a sobrevivência em meios hipersalinos. Uma mudança repentina de metabolismo aeróbio para fermentativo na presença de estresse salino já foi relatada para a bactéria *E. coli* (METRIS et al., 2014). Neste estudo, foi observado que este fenômeno só ocorria na presença de osmoprotetores, tais como prolina e glicilbetaína. Alterações metabólicas similares podem ter ocorrido no presente trabalho, visto que foi observada fermentação de manitol apenas na presença de 7,5% de NaCl para alguns isolados.

O acúmulo de solutos orgânicos compatíveis (osmoprotetores), responsáveis por manter a osmolaridade da célula sem inibir a maquinaria enzimática, é um artifício usado na sobrevivência em meios hipersalinos. Neste caso, estes solutos são sintetizados pelas células ou adquiridos a partir do meio. Portanto, o uso desta estratégia fornece a vantagem de pouca adaptabilidade necessária por parte da maquinaria enzimática. Vários solutos orgânicos compatíveis já foram identificados, incluindo manitol (OREN, 2006).

A hidrólise de tirosina é uma característica também utilizada para fins de caracterização de microrganismos. Dentre todos os isolados testados, quatro (A5, A7, E10 e E12) foram capazes de formar halo claro em meio Ágar tirosina. O isolado com maior atividade foi o E12, que apresentou halo de hidrólise visível após quatro dias de incubação, enquanto que A7 o fez após o décimo dia de incubação. O isolado E10 apresentou halo não completamente transparente, mesmo após 17 dias de incubação. Já o isolado A5 apresentou halo transparente após 22 dias de incubação.

5.3.4 Produção de catalase

Catalase é uma enzima que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Faz parte da estratégia que muitos organismos utilizam para diminuir os efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio gerado durante a

respiração aeróbica. Esta enzima também é usada como forma de caracterização e diferenciação de microrganismos, principalmente para bactérias.

A capacidade de produção de catalase foi testada para todos os microrganismos isolados. Todos, exceto o isolado A7, apresentaram reação positiva (liberação de oxigênio após de adição de solução de peróxido de hidrogênio às colônias). O que significa que todos os isolados, exceto A7, são adaptados a sobreviverem na presença de oxigênio, podendo possuir metabolismo aeróbio ou anaeróbico facultativo.

5.4 Potencial Biotecnológico dos Isolados

Os isolados foram testados quanto à capacidade de secretar diversas enzimas de interesse industrial e biotecnológico, como celulasas, xilanases, pectinases, proteases, amilases, lipases, DNAses, Lacases, Polifenoloxidasas e Tirosinases.

5.4.1 Produção de celulasas, xilanases, lacases, tirosinases e polifenoloxidasas

Os isolados foram testados quanto à capacidade de degradação de celulose microcristalina (produção de avicelases), de carboximetilcelulose (CMC) (produção de CMCases), de xilano de madeira de faia (xilanases), oxidação de guaiacol (lacases), de ácido gálico (polifenoloxidasas) e de tirosina (tirosinases). Os resultados dos testes podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Capacidade de degradação de celulose, xilano de madeira de faia, oxidação de guaiacol, de ácido gálico e de tirosina das bactérias e de leveduras isoladas da casca do coco-verde em fermentação.

Bactérias	CMCcases	Avicelases	Xilanases	Lacases	Polifenoloxidasas	Tirosinases
A1	4,14 ^b	-	±	-	-	-
A2	-	-	-	-	+	-
A3	5,10 ^a	-	±	-	+	-
A5	3,23 ^c	1,74 ^a	3,58 ^a	-	+	+
A8	3,47 ^c	-	±	-	-	-
B1	4,92 ^a	+	±	-	-	ND
B2	1,75 ^d	+	±	-	+	ND
B3	3,64 ^c	+	+	ND	-	ND
B7	-	-	-	-	+	-
B9	3,17 ^c	~1	<1	-	+	-
B11	3,90 ^b	-	-	ND	+	ND

Tabela 7 – continuação...

D1	1,78^d	1,87^a	-	-	+	-
D2	-	-	1,91 ^{ab}	ND	+	-
D4	1,71 ^d	~1	~1	ND	+	-
D6	2,07 ^d	-	-	ND	+	-
Leveduras						
A6	-	-	-	-	-	-
A7	-	1,27 ^b	-	-	-	-
B4	-	-	<1	-	-	-
B6	-	-	<1	-	+	-
B8	-	-	1,33 ^b	-	-	-
B10	-	-	1,38 ^{ab}	-	-	-
C1	-	1,65 ^a	<1	-	+	-
C2	-	-	-	-	+	-
C5	-	-	+	-	±	ND
C6	-	-	-	-	+	-
C7	-	-	<1	-	+	-
C10	-	-	<1	-	+	-
D3	-	-	±	ND	+	-
D5	-	-	-	-	+	-
E1	-	-	-	-	+	-
E2	-	-	<1	-	+	-
E4	-	-	2,57 ^{ab}	-	-	-
E7	-	-	<1	-	+	-
E9	-	-	-	-	+	-
E10	-	-	1,52 ^{ab}	-	+	-
E11	-	-	1,30 ^b	-	+	-
E12	-	-	<1	-	+	-
E13	-	-	-	-	+	-

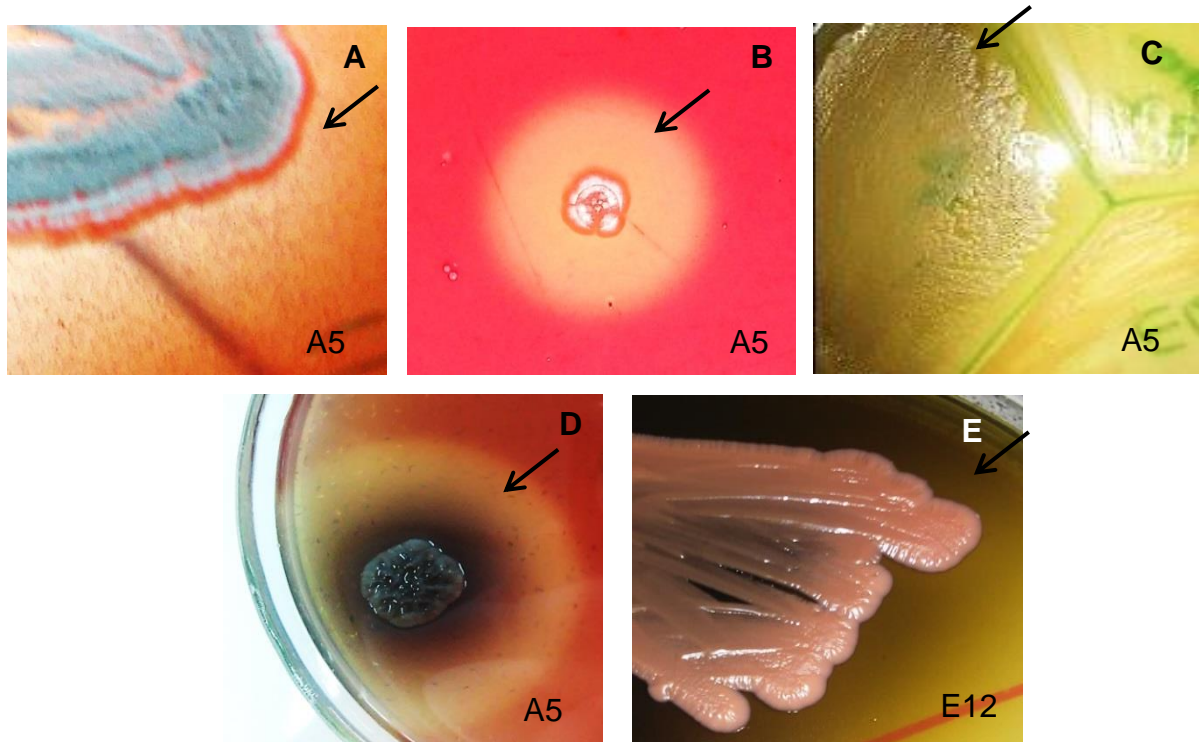
+: atividade detectada (IE não medido); -: atividade não detectada; ±: atividade baixa detectada (IE não medido); ND: Não determinado. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente distintas de acordo com o teste de Scot-Knott ou de Kruskal-Wallis (xilanases) a 5% de probabilidade. Os valores marcados em negrito se referem a incubação por 72h quando realizado por dois períodos de incubação distintos.

Fonte: o autor (2016)

A quantidade de isolados bacterianos capazes de degradar celulose foi maior que o de leveduras. Seis bactérias foram capazes de degradar ambos os substratos, quatro degradaram apenas CMC e dois degradaram apenas celulose microcristalina, totalizando 12 isolados bacterianos com atividade celulolítica. Dentre as leveduras testadas, somente duas apresentaram atividade de degradação de celulose

microcristalina. Exemplos de formação de halo de hidrólise de celulose podem ser vistos nas Figuras 12A e 12B

Figura 12 – Atividade de enzimática dos isolados A5 e E12. A: avicelase, B: carboximetilcelulase, C: tirosinase, D: xilanase e E: polifenoloxidasas. As setas indicam a zona de atividade.



Fonte: o autor (2016, 2017)

Os isolados que mais se destacaram pela degradação de carboximetilcelulose por apresentarem valores de IE maiores que 2 foram A1, A3, A5, A8, B1, B3, B9, B11 e D6, apresentando potencial para a produção industrial de carboximetilcelulase. Já os isolados A5 e D1 se destacaram pela degradação de celulose microcristalina, apresentando valores de IE de 1,74 e 1,87, respectivamente, com três dias de incubação. Quando incubado por sete dias, os isolados apresentaram, respectivamente, IE igual a 3,63 e 2,24 (Dados não mostrados).

Os IE de maiores valores foram obtidos dos isolados bacterianos e, em geral, os correspondentes a degradação de CMC são maiores que para a de celulose microcristalina. Uma possível explicação é o fato de que a celulose microcristalina é mais resistente à degradação enzimática em razão de sua maior cristalinidade,

menor solubilidade, sendo menos acessível à enzima. Já a carboximetilcelulose é uma forma mais solúvel de celulose, sendo mais vulnerável ao ataque enzimático. Além disso, já foi demonstrado que a hidrólise de CMC pode ocorrer por ação de enzimas não-celulolíticas, como as β -glucanases (LYND et al., 2002).

Os índices enzimáticos obtidos para a degradação de celulose em meio celulose-vermelho congo estão na faixa de 1,27 a 1,87. Estes resultados contrastam com obtidos por Gupta et al. (2012), que isolaram 8 linhagens bacterianas degradadoras de celulose do estômago de quatro diferentes invertebrados (cupim, lesma, lagarta e traça) e encontraram índices enzimáticos variando de 4,3 a 9,0 obtidos em meio celulose-vermelho congo. Estes isolados foram capazes de degradar papel de filtro quando incubados em meio líquido, sendo as enzimas celulolíticas FPCases (“FilterPaperCelulases”, envolvidas na liberação de glicídios redutores de papel de filtro) e endoglucanases detectadas nos sobrenadantes das culturas.

Os índices enzimáticos foram calculados para atividade em meio sólido. Boa correlação entre os valores de IE em meio sólido e a atividade enzimática em meio líquido já foi verificada para alguns estudos (CESKA et al., 1971; KAMBLE; KAMBLE; MUSADDIQ, 2011), mas Liang et al. (2014) observaram que esta correlação nem sempre é verdadeira. Estes pesquisadores isolaram 245 linhagens de bactérias degradadoras de celulose de diferentes reservas naturais da região subtropical da China e encontraram que 22 destas linhagens produziram claramente halo de hidrólise de CMC em meio sólido. No entanto, apenas três destes isolados (*Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Paenibacillus terrae*) apresentaram atividade de CMCCase detectável em meio líquido. Portanto, as linhagens que apresentaram atividade em meio sólido também deverão ser testadas quanto à produção enzimática em meio líquido.

A existência de leveduras capazes de degradar celulose já foi descrita na literatura. Entretanto, o número de linhagens com esta capacidade aparenta ser menor que o de bactérias. Goldbeck et al. (2012) conduziram um estudo com leveduras isoladas de diversas matrizes de biomas brasileiros e encontraram que, das 390 linhagens testadas para a degradação de celulose, apenas 16 (4,44%) produziram halo de hidrólise em meio sólido. Entre estas, cinco se destacaram quanto ao IE, cujo valor máximo foi de 12,46 após 96 h de incubação em meio semissintético com CMC como substrato. Estes resultados concordam em parte com

os obtidos neste trabalho. Enquanto que a percentagem de leveduras (8,69%,) que apresentaram hidrólise de celulose é semelhante à obtida pelos autores, os valores de IE são cerca de sete vezes maiores que os obtidos neste trabalho.

Há uma gama de aplicações para microrganismos produtores de celulasas. Gupta et al. (2012) utilizaram uma cultura mista de quatro linhagens de bactérias celulolíticas com a levedura *S. cerevisiae* em meio basal contendo papel de filtro ou celulose em pó e observaram produção de etanol pela ação fermentativa da levedura nos glicídios liberados pela atividade celulolítica das bactérias.

Experimento semelhante foi realizado por Sukumaran et al. (2009), que utilizaram o extrato enzimático bruto dos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus niger* MTCC 7956 para a hidrólise de resíduos agrícolas pré-tratados e posterior fermentação alcoólica do hidrolisado com *S. cerevisiae*. Estes pesquisadores obtiveram um rendimento de 0,093g de etanol/g de palha de arroz pré-tratada.

Dentre os isolados testados, 25 apresentaram atividade de xilanases. No entanto, apenas as bactérias A5 e D2 e as leveduras B8, B10, E4, E10 e E11 apresentaram índices enzimáticos superiores a um. Dentre estes, A5 e E4 se destacam por apresentarem $IE > 2,5$, sendo 3,58 e 2,57, respectivamente. O halo de degradação de xilano pelo isolado A5 pode ser visualizado na Figura 12D.

Microrganismos produtores de hemicelulases, incluindo xilanases, possuem participação fundamental na degradação da matéria orgânica de origem vegetal. Diversos estudos na literatura possuem como objetivo a prospecção de bactérias, leveduras ou fungos capazes de produzirem xilanases.

Alves-Prado et al. (2010) isolaram 50 linhagens bacterianas e 15 linhagens de fungos filamentosos de amostras de solo cobertas por madeira e material em decomposição e constataram que 5 bactérias e 4 fungos eram capazes de produzir grandes quantidades de xilanases, compondo respectivamente 10% e 26,7% do total de bactérias e fungos isolados. Dentre estas, a bactéria *Lysinibacillus* sp. P5B1 e o fungo *Neosartorya spinosa* P2D19 foram identificados como os isolados com maior potencial xilanolítico. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, visto que duas das 15 bactérias (13,3%) e cinco das 23 leveduras (21,7%) apresentaram IE superior a 1, indicativo de produção extracelular de xilanase.

Num estudo semelhante, Otero et al. (2015) isolaram 119 linhagens de leveduras de diferentes matrizes orgânicas e investigaram a capacidade destes

isolados de produzirem xilanases livres de celulasas utilizando dois meios de triagem diferentes, um contendo apenas xilano e ágar e outro complementado com extrato de levedura e uma solução de minerais (pH 5,0). Estes pesquisadores encontraram que 23 isolados (19,3%) foram capazes de degradar xilano após 72h de incubação a 30°C, dos quais sete linhagens foram selecionadas por apresentarem atividade em ambos os meios com valores de índice enzimáticos variando entre 2 e 6, sendo o isolado com maior produção em meio líquido identificado como *Cryptococcus laurentii*. Foram encontrados resultados semelhantes neste trabalho quanto à proporção de leveduras xilanolítica isoladas (21,7%) no mesmo período de incubação e temperatura ligeiramente superior (32°C).

Microrganismos produtores de xilanases podem realizar a transformação de xilano em glicídios assimiláveis por uma grande quantidade de microrganismos. Deste modo, estes microrganismos ou seus extratos enzimáticos podem ser aplicados na sacarificação da biomassa rica em xilano, como determinados resíduos agrícolas. O produto de sacarificação pode ser usado para diversos fins. Por exemplo, pode servir como fonte de carbono e energia em processo fermentativo para a produção de insumos químicos como ácido láctico, etanol, entre outros. Além disso, já que o produto de sacarificação possui altas concentrações de xilose, ele pode ser quimicamente reduzido a xilitol, um adoçante com aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia (JUTURU e WU, 2012; CHEN et al., 2010).

Dentre os isolados testados, apenas A5 mostrou atividade de tirosinase (Figura 12C), enquanto que nenhum apresentou atividade de lacase. A atividade de polifenoloxidasas foi detectada em 28 dos isolados testados, sendo 11 bactérias e 17 leveduras. Exemplo da formação de compostos de cor escura para a detecção de atividade de polifenoloxidasas pode ser visto na Figura 12E.

Como pode ser observado na Tabela 7, apenas o isolado A5 apresentou atividade de tirosinase, que pode ser a enzima responsável pela reação de Bavendamm (atividade de polifenoloxidase) deste isolado. Entretanto, outros 27 isolados apresentaram reação de Bavendamm, mas nenhum apresentou atividade de lacase ou tirosinase. Segundo Käärik (1965), existem alguns tipos de compostos indicadores de atividade de polifenoloxidasas. Alguns são específicos para lacase, como o guaiacol, outros são específicos para tirosinase, como a tirosina, e outros são inespecíficos, servindo como substrato para ambas as enzimas, como ácido gálico. Logo, uma das possíveis explicações para a discrepância entre atividade de

oxidação de ácido gálico e ausência de atividade de lacase e tirosinase é que as enzimas responsáveis pela reação de Bavendamm não são lacases ou tirosinases ou que se tratam de lacases com baixa afinidade ao guaiacol.

Outra explicação para a discrepância observada é que a produção das enzimas responsáveis pela oxidação de ácido gálico pode não ter sido induzida em meio com guaiacol ou que a concentração deste não foi suficientemente alta para que seu produto de oxidação fosse detectado. Resultados semelhantes já foram descritos na literatura. Por exemplo, Lee e Oh (1998) testaram 94 diferentes linhagens de fungos degradadores de madeira quanto à capacidade de produção de polifenoloxidasas por um método modificado de Bavendamm e produção de lacases com siringaldazina como indicador e observaram que a maioria dos fungos que apresentou reação de Bavendamm também apresentou reação positiva para lacase. Entretanto, várias exceções foram encontradas, nas quais os fungos só apresentaram um tipo de atividade.

Enzimas como lacases, tirosinases e outras polifenoloxidasas possuem aplicação em diversos setores. Lacases, por exemplo, podem ser aplicadas em biorremediação através da remoção de corantes sintéticos tóxicos do meio ambiente. Seguindo esta linha de raciocínio, Saparrat et al. (2008) estudaram uma lacase extracelular produzida pelo fungo da podridão branca *Grammothele subargentea* e observaram que este fungo possui a capacidade de descoloração em meio sólido de diversos corantes, tais como verde brilhante, cristal violeta, rosa bengala, vermelho de metila, vermelho do congo, entre outros.

Tirosinases também podem ser aplicadas em biorremediação, principalmente na remoção de compostos fenólicos. Ikehata e Nicell (2000) realizaram um estudo envolvendo uma tirosinase de cogumelo na oxidação e diminuição da toxicidade de fenóis em solução aquosa e encontraram que o tratamento enzimático diminuiu a toxicidade bem como a concentração da maioria dos fenóis estudados (fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol e 4-clorofenol), sendo que os resultados mais pronunciados ocorreram quando as soluções foram tratadas com tirosinase em conjunto com quitosana, substância necessária para a remoção dos produtos coloridos formados pela ação enzimática. Entretanto, também observaram que apesar do tratamento de 2,4-diclorofenol com tirosinase e quitosana ter resultado na transformação completa deste substrato, ocorreu geração de produtos de maior toxicidade.

5.4.2 Produção de amilases, pectinases, proteases, lipases/esterases e DNAses

A capacidade de produção de amilases, pectinases, proteases, lipases/esterases e DNAses foi testada. Os testes de amilases foram realizados com duas concentrações de amido diferentes, 1% e 0,2% (m/v). Os resultados dos testes, bem como os índices enzimáticos calculados, podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Produção de amilases, pectinases, proteases, lipases/esterases e DNAses das bactérias e leveduras isoladas neste trabalho.

Bactérias	Amilase 1%*	Amilase 0,2%*	Pectinases	Proteases	Lipases/ esterases	DNAses
A1	-	-	-	6,17 ^d	-	1,65 ^b
A2	-	-	-	1,15 ^{ab}	-	-
A3	-	-	-	4,37 ^{cd}	-	1,76 ^b
A5	2,80 ^a	3,60 ^a	3,47 ^a	1,34 ^{abc}	2,00 ^{abc}	2,11 ^a
A8	-	-	-	2,05^{abcd}	-	2,34 ^a
B1	-	-	-	+	-	ND
B2	-	-	-	±	-	ND
B3	-	-	-	+	-	ND
B7	-	2,78 ^b	-	-	-	-
B9	-	-	-	-	-	1,65 ^b
B11	-	±	-	+	-	-
D1	-	-	-	1,58 ^{efg}	-	1,17 ^d
D2	1,16 ^c	-	-	-	-	-
D4	-	1,81 ^c	-	1,08 ^a	-	1,39 ^c
D6	-	-	-	2,07^{abcd}	-	1,60 ^b
Leveduras						
A6	-	-	-	<1	-	-
A7	-	-	-	2,39 ^{abcd}	-	-
B4	-	-	-	2,44 ^{abcd}	-	-
B6	-	<1	-	+	1,51 ^{abc}	+
B8	-	<1	1,73 ^{abc}	2,36^{abcd}	1,82^{abc}	+
B10	-	2,97 ^b	2,62 ^{ab}	-	2,08^{abc}	1,64 ^b
C1	-	-	-	1,14^{ab}	-	-
C2	-	<1	-	2,86 ^{bcd}	1,37^{ab}	ND
C5	-	±	ND	-	-	ND
C6	-	-	-	-	+	-
C7	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	1,39 ^{abc}	-
D5	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	-	-	+	-

Tabela 8 – continuação...

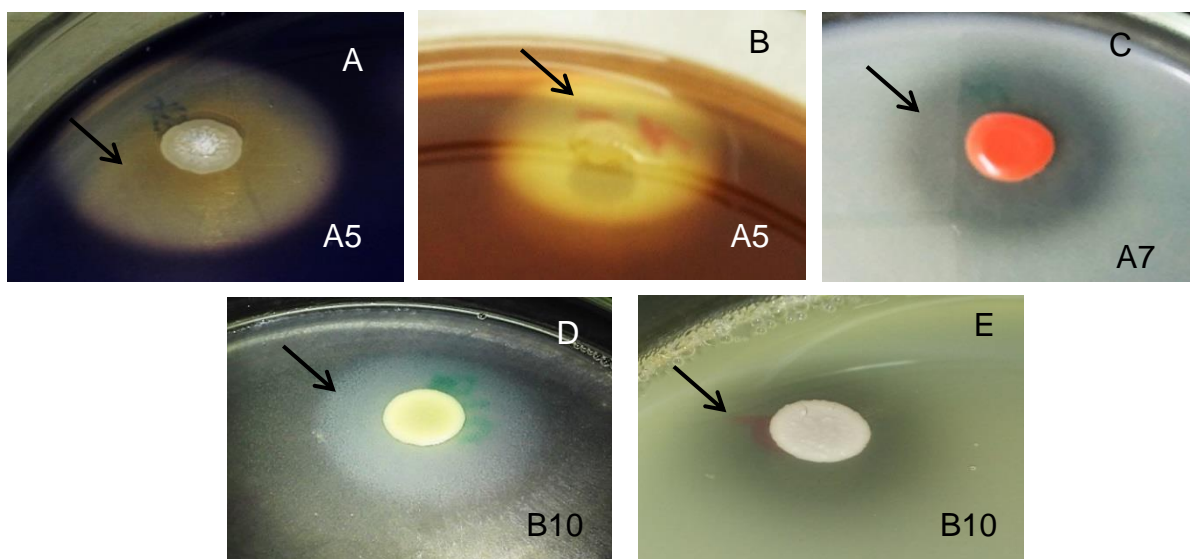
E2	-	<1	-	-	1,08^a	-
E4	2,20 ^b	2,01 ^c	1,17 ^c	1,73 ^{abcd}	5,70 ^c	-
E7	-	-	-	-	1,40 ^{abc}	-
E9	-	-	-	-	-	ND
E10	-	<1	1,42 ^{abc}	-	4,60 ^{bc}	+
E11	-	-	1,23 ^{bc}	-	5,10 ^{bc}	+
E12	-	-	-	2,10 ^{abcd}	-	+
E13	-	-	-	-	1,50 ^{abc}	-

+: atividade detectada (IE não calculado); -: atividade não detectada; ±: atividade baixa detectada (IE não calculado); ND: Não determinado. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente distintas de acordo com o teste de Scot-Knott ou Kruskal-wallis (pectinases, proteases, lipases/esterases) a 5% de probabilidade. * Concentração de amido usada no meio de cultura. Os valores em negrito foram obtidos com 72h de incubação (para testes feitos em dois períodos de incubação diferentes).

Fonte: o autor (2016)

Dos isolados testados, A5, D2 e E4 mostraram atividade amilolítica detectável em meio contendo 1% de amido, com IE de 2,80, 1,16 e 2,20; sendo A5 e E5 potenciais candidatos para a produção industrial de amilases (IE > 2). Por outro lado, 12 isolados apresentaram atividade quando o meio possuía 0,2% de amido. Destes, quatro são linhagens bacterianas e oito linhagens de leveduras. Os isolados A5, B7, B10 e E4 se destacaram por apresentar índices enzimáticos de 3,60, 2,78, 2,97 e 2,01, respectivamente. Exemplo do halo de degradação de amido pode ser visto na Figura 13A.

Figura 13 – Atividade de enzimática dos isolados A5, A7 e B10. A: amilase, B: pectinase, C: protease, D: lipase/esterase e E: DNase. As setas indicam o halo de atividade.



Fonte: o autor (2016, 2017)

O uso de amilases de origem microbiana é uma alternativa rentável ao uso de amilases de outras origens. Com este objetivo, vários estudos sobre o potencial de produção de amilases por bactérias e fungos já foram realizados. Por exemplo, Specian et al. (2016) estudaram 34 linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas de acerola e constataram que nove isolados (*Staphylococcus* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus* spp., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus tequilensis*, *Acineobacter johnsonii*) apresentaram atividade amilolítica com valores de IE variando entre 1,25 e 2,15 em meio com 1% de amido, faixa de valores mais estreita que a encontrada neste trabalho (1,16 – 2,80) para os isolados bacterianos e mesma concentração de amido.

Abe et al. (2015) testaram a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas de 33 linhagens de fungos isolados de grãos de milho com sintomas de podridão, incluindo amilases (0,2% de amido solúvel), e encontraram que 14 dos fungos testados apresentaram atividade amilolítica cujos valores de IE variaram entre 1,04 e 4,37, sendo este último correspondente à atividade do fungo *Hyphopichia burtonii*. Os valores de IE encontrados por estes autores estão numa faixa mais ampla do que os encontrados neste trabalho para as leveduras (1,00 a 2,97) com meio possuindo mesma concentração de amido, demonstrando diferenças entre a atividade amilolítica de fungos filamentosos e leveduras.

O número de isolados cuja atividade de amilase foi detectada em meio com 0,2% de amido (12 isolados) foi maior que em meio com 1% (três isolados). Isso pode ser devido à baixa atividade enzimática, que não foi capaz de degradar amido o suficiente no meio contendo 1% para ser detectado pela coloração com solução de lugol. Outros fatores que podem estar envolvidos incluem afinidade enzimática e efeito da pressão osmótica.

Amilases possuem aplicação em diferentes áreas. Existem estudos mostrando que podem ser usadas, por exemplo, para assistir à síntese de nanopartículas, tais como de prata (MISHRA; SARDAR, 2012), ouro (MISHRA; SARDAR, 2014) e TiO₂ (AHMAD et al., 2015); e também podem ser aplicadas na indústria de alimentos. Por exemplo, Onderci et al. (2006) estudaram os efeitos da suplementação de duas linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas com a capacidade de produção de α -amilase na performance, uso nutricional e morfologia visceral de frangos de corte alimentados com dieta a base de milho e constataram

que a suplementação com tais linhagens bacterianas melhoraram a digestibilidade de nutrientes e a performance dos frangos utilizados no estudo.

Dentre as bactérias testadas, apenas A5 mostrou capacidade de produção de pectinases, com valor de índice enzimático igual a 3,47. Já cinco das 22 leveduras testadas degradaram pectina, destacando-se o isolado B10, com IE igual a 2,62. O halo de degradação de pectina do isolados A5 pode ser visualizado na Figura 13B.

A incidência de microrganismos produtores de pectinases observada neste trabalho foi baixa, sendo uma bactéria (6,7%) e cinco leveduras (22,7). Estes resultados contrastam com os observados por Román-Ponce et al. (2016), que realizaram uma triagem enzimática de bactérias endofíticas associadas às plantas *Sphaeralcea angustifolia* e *Prosopis laegivata*, resistentes a metais pesados, e encontraram que 72,5% dos isolados (29/40) possuíam a capacidade de produzir pectinases. Neste mesmo estudo, os isolados que apresentaram maior índice enzimático em 48h de incubação (1,80) foram as linhagens de *Bacillus* sp. NM3E10 e *Bacillus vallismortis* CM1E6.

Num estudo realizado por Silva, M. et al. (2016), a triagem enzimática realizada com 102 linhagens de bactérias endofíticas obtidas de sementes de *Paullinia cupana* revelou que 10,8% dos isolados apresentaram atividade pectinolítica, sendo que o maior valor de IE encontrado foi de 1,66, pertencente ao isolado *Bacillus* sp. 1B.11B(AM). Já no o presente estudo, o valor de índice enzimático apresentado pelo isolado A5 (IE=3,47) é muito superior aos valores encontrados nos estudos citados anteriormente, o que demonstra seu potencial para a produção industrial de enzimas pectinolíticas.

Microrganismos eucarióticos também podem servir como fontes de enzimas pectinolíticas. Por exemplo, Rezende et al. (2013) isolaram 182 linhagens de fungos filamentosos de grãos de café e avaliaram sua capacidade de produção de enzimas pectinolíticas (pectato liase e poligalacturanase). Estes pesquisadores encontraram que 42 isolados apresentaram $IE \geq 2$, sendo que as duas linhagens de *Penicillium brevicompactum* DCA03 e DCA06 apresentaram os maiores valores de IE, 2,80 (pectato liase) e 3,60 (poligalacturanase), respectivamente. Embora não tenha alcançado os valores de IE apresentados no estudo por Rezende et al. (2013), os isolados B10 e E4, que apresentaram IE mais elevados (2,62 e 2,09) ainda apresentam potencial como produtores industriais, visto que os valores apresentados são superiores a 2.

Enzimas pectinolíticas possuem aplicação em diversos setores da indústria. Podem ser aplicadas no processamento de frutas e vegetais, de alimentos para animais, de café e chá, na indústria têxtil, na extração de óleos vegetais, entre outras aplicações (GARG et al., 2016). Exemplo de aplicação industrial é o estudo realizado por Collares et al. (2012), que utilizaram um coquetel enzimático para a hidrólise do amido de mandioca e constataram que a adição de pectinases aumentou o rendimento da reação, que chegou a 22g de glicídios redutores/(L.h) sob condições otimizadas. Estes poderiam ser utilizados como fonte de carbono e energia para uma variedade de microrganismos, servindo como uma fonte de carboidratos mais barata e que apresenta potencial para a biotransformação em produtos com maior valor agregado dependendo do microrganismo utilizado.

Dentre os isolados testados, vinte e um apresentaram atividade proteolítica em meio contendo leite desnatado. Das 15 linhagens bacterianas testadas, doze (80%) apresentaram atividade proteolítica. Este resultados contrastam com os obtidos por Ghasemi et al. (2011), que isolaram 40 linhagens bacterianas do lago de salgado Moharloo, sul de Shiraz, Iran, e verificaram que 16 isolados (40%) produziram proteases extracelulares em meio sólido com leite desnatado, sendo as linhagens produtoras identificadas como *Bacillus* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Halobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Aeromonas* sp. e *Aeromonas veroni*, entre outras. Um estudo semelhante foi realizado por Alnahdi (2012), que isolou seis linhagens bacterianas proteolíticas de amostras de água e sedimentos da costa do Mar Vermelho e identificou a linhagem com maior potencial de produção (243 U/mL) como *Bacillus* sp. 2 EHN.

Nove das 23 linhagens (39,1%) de leveduras testadas apresentaram atividade proteolítica. Estes resultados vão de encontro aos observados por Vale et al. (2015), que investigaram a produção de proteases por linhagens de leveduras isoladas de frutos do babaçu e encontraram que 73,8% dos isolados produziram proteases em meio sólido com diferentes valores de pH com até 72h de incubação. Os isolados que apresentaram atividade proteolítica em pelo menos um valor de pH pertenciam aos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikow*, *Starmerella* e *Aureobasidium*.

Entretanto, os resultados para as leveduras testadas corroboram com os encontrados por Abe et al. (2015), que investigaram a produção de proteases por fungos filamentosos isolados de grãos de milho e encontraram que 14 das 33

linhagens testadas (42,4%) apresentaram atividade proteolítica em meio sólido contendo caseína de leite. Dentre as linhagens proteolíticas estavam os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Sorocladium* e *Trichoderma*.

Os isolados que mais se destacaram pela produção de proteases foram as bactérias A1, A3, A8 e D6 e as leveduras A7, B4, B8, C2 e E12, todos com IE > 2. O valor máximo de IE obtido foi de 6,17, pertencente ao isolado A1. O halo de degradação formado pelo isolado A7 em meio ágar-leite desnatado pode ser observado na Figura 13C.

Valores elevados de índice enzimáticos para a atividade proteolítica, conforme os observados neste trabalho, já foram documentados na literatura. Por exemplo, Specian et al. (2016) obtiveram isolados bacterianos endofíticos de acerola cujos valores de índices enzimáticos para a atividade proteolítica variaram entre 1,20 e 4,80. Katoch et al. (2014) examinaram a capacidade proteolítica de fungos endofíticos associados à planta etnomedicinal *Bacopa monnieri* e obtiveram valores de IE que variaram entre 2,5 e 3,33. Entretanto, valores de IE menores que 2,0 são mais comumente encontrados, tanto para bactérias quanto para fungos. Por exemplo, Silva, M et al. (2016) estudaram bactérias endofíticas associadas a sementes de guaraná e encontraram que das 34 linhagens testadas para a capacidade de produção de proteases, vinte e quatro apresentaram atividade, sendo que apenas três isolados exibiram valores de IE superiores a 2.

A produção de lipase e/ou esterases foi detectada em meio sólido através da capacidade dos isolados de hidrolisar o surfactante Tween 80. Este composto vem sendo usado por alguns pesquisadores como substrato para lipases (HABA et al., 2000; KUMAR, D. et al., 2012) enquanto que outros o utilizam como substrato para esterases (SPECIAN et al., 2016; MINOTTO et al., 2014). Por esta razão, as reações positivas aqui indicadas se referem à produção de lipases e/ou esterase, visto que ambas podem hidrolisar Tween 80.

Atividade lipolítica/esterásica foi detectada em 14 isolados (uma bactéria e 13 leveduras). O halo de formação de oleato de cálcio pela ação de lipases/esterases do isolado B10 pode ser visualizado na Figura 13D. Os resultados obtidos pela atividade lipolítica/esterásica e os índice enzimáticos calculados podem ser observados na Tabela 8.

A capacidade de produção de lipase e/ou esterases em microrganismos pode ser encontrada tanto em fungos quanto em bactérias. Os isolados que mais se destacaram em termos de IE foram as linhagens de levedura E4, E10 e E11, com valores de IE superiores a 4,50. Apenas um isolado bacteriano (A5) apresentou reação positiva no meio testado, tendo valor de IE igual a 2. Entretanto, isto não significa afirmar que, necessariamente, os outros isolados não produzem lipases ou esterases. Uma afirmação mais precisa é que estes não foram capazes de hidrolisar Tween 80 nas condições de cultivo utilizadas.

Minotto et al. (2014) estudaram a produção de diversas enzimas por actinobactérias isoladas de plantas de tomate em diferentes temperaturas e incubadas durante 7 dias, incluindo lipases e esterases, e encontraram que o fator temperatura afeta a detecção de produção enzimática. Por exemplo, o isolado 26(3) não foi capaz de hidrolisar Tween 80 a 25°C ou a 28°C, mas o fez quando incubado a 30°C. Além disso, foi verificado que os valores de IE calculados variaram estatisticamente para alguns dos isolados de acordo com a temperatura, sendo os valores máximos de 6,8 a 25°C, 5,58 a 28°C e 5,59 a 30°C. No presente trabalho, o isolado E4 apresentou valor máximo de IE (5,70) superior ao obtido por aqueles pesquisadores em temperaturas superiores a 30°C, demonstrando seu potencial para a produção de lipases/esterases a temperaturas maiores.

Além da temperatura, o fator pH também pode afetar a detecção de atividade lipolítica. Long et al. (2004) isolaram diferentes linhagens de bactérias, leveduras e fungos de moinho de óleo de palma e investigaram suas atividades lipolíticas em diferentes valores de pH e temperaturas. Estes pesquisadores encontraram um perfil de produção de lipases diferente para cada isolado dependendo da temperatura e do pH. Enquanto que a maioria dos isolados foi capaz de manter a atividade lipolítica na faixa de valores pH entre 6 e 10 (as bactérias *Bacillus lentus*, *Bacillus sphaericus*, CDC gr. IV C-2 e o fungo *Neurospora crassa*), as linhagens de *K. pneumoniae rhinosclero* e *Rahnella aquaticus* apresentaram atividade apenas nos valores de pH 6 e 7. A variação na temperatura de incubação também teve efeito similar, sendo que alguns isolados não cresceram nas temperaturas de 40°C, 45°C e 50°C, o isolado *B. lentus* foi ativo entre 30°C e 45 °C, o isolado CDC gr. IV C-2 apresentou atividade entre 30°C e 40°C, enquanto que os outros isolados mostraram atividade apenas em 30°C e 35°C.

Specian et al. (2016) determinaram a atividade lipolítica de bactérias endofíticas associadas a *Malpighia emarginata* e encontraram que as linhagens de *B. thuringiensis* G1O38 (B), G2O29 (B) e G3O15 (B), *B. tequilensis* G2O26 (B) e *Acinetobacter johnsonii* G3O25 (B) foram capazes de hidrolisar Tween 80 com valores de IE entre 1,20 e 1,62 obtidos após incubação a 28°C. Esta é faixa de valores é inferior à obtida neste trabalho (1,08 a 5,70), o que demonstra maior potencial lipolítico/esterásico por parte dos isolados da casca do coco-verde, especialmente as leveduras.

Existem dados na literatura a respeito do isolamento de microrganismos a partir de coco fermentado e avaliação de sua atividade lipolítica. Rajesh et al. (2013) isolaram 12 linhagens bacterianas lipolíticas de coco fermentado seco ao sol e selecionaram uma linhagem bacteriana, identificada como *Lysinibacillus Fusiformis* C5, que era capaz de produzir lipases resistentes a solventes orgânicos.

Os isolados foram testados quanto sua capacidade de produção de DNAses, enzimas capazes de hidrolisar as ligações fosfodiésteres presentes nos ácidos desoxirribonucleicos (KAMBLE; KAMBLE; MUSADDIQ; 2011). Exemplo de halo de hidrólise de DNA pode ser visto na Figura 13E.

Um total de 14 isolados apresentaram capacidade de produção de DNAses, sendo 8 bactérias e 6 leveduras. Diversos gêneros de bactérias e leveduras são conhecidos produtores de DNAses extracelulares. Cazin et al. (1969) testaram um total de 20 gêneros de leveduras e fungos semelhantes a leveduras quanto à capacidade de produção de DNAses extracelulares e encontraram que tal capacidade parece estar agrupada em três gêneros distintos (*Rhodothorula*, *Cryptococcus* e *Tremella*), tendo uma linhagem de *Endomycopsis fibuligera* como exceção, já que esta também foi capaz de produzir DNAses extracelulares. Estes pesquisadores sugeriram que a determinação de capacidade de produção de DNAses pode auxiliar na identificação ou classificação taxonômica de determinados isolados.

Kamble, Kamble e Musaddiq (2011) isolaram de amostras de solo e identificaram dez linhagens bacterianas capazes de produzir DNAses extracelular. As linhagens identificadas foram de *Bacillus* spp. (quatro isolados), *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (dois isolados), *Serratia marcescens* e *coccus* sp.

DNases extracelulares possuem atividade de regulação de crescimento em biofilme bacteriano para algumas linhagens de bactérias. Além disso, algumas DNases possuem atividade rompedora de biofilme, o que as torna valiosas para limpeza de materiais comumente infectados por bactérias formadoras de biofilmes ou no tratamento de doenças relacionadas à formação de biofilmes bacterianos (KRANTHI; APARNA; SARADA, 2014; TRAN, 2016). Outras aplicações de DNases incluem a manipulação de DNA por técnicas de biologia molecular (KAMBLE; KAMBLE; MUSADDIQ; 2011).

5.4.3 Degradação de papel de filtro

5.4.3.1 Teste 1

Os isolados A3, A5, A7 e B9 foram selecionados para este teste com base em suas capacidades de produção de CMCases e/ou avicelases. O período de avaliação do teste foi de 41 dias, quando o crescimento dos isolados por meio de turvação no meio de cultura, a formação de colônias no papel de filtro e a integridade física do papel de filtro ao final do período de avaliação foram avaliados. Para este primeiro teste foram utilizados dois meios líquidos nos quais a única diferença é a fonte de nitrogênio utilizada (sulfato de amônio ou hidrolisado enzimático de caseína).

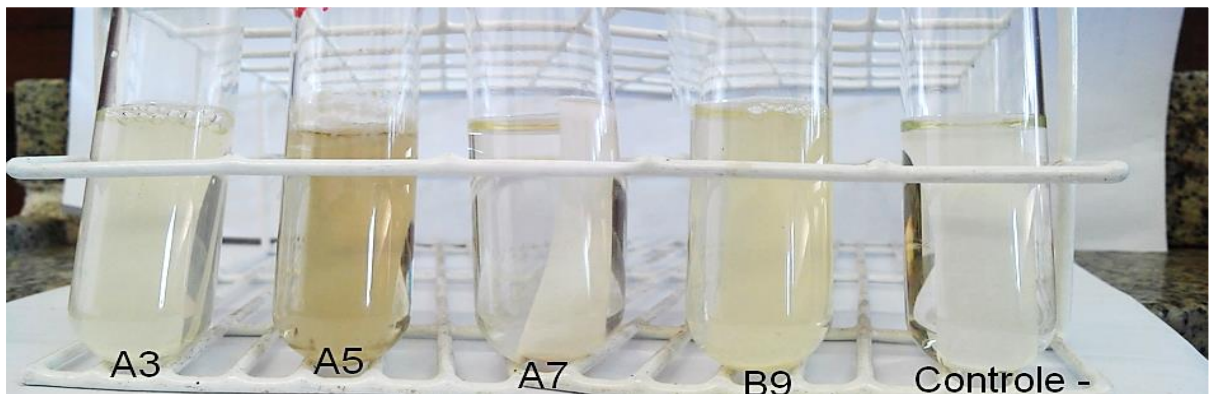
Em termos gerais, o meio 1, que possui fonte de nitrogênio de origem orgânica, promoveu melhor crescimento dos isolados. Ao final do período de avaliação, todos os isolados apresentaram crescimento para este meio de cultura. Entretanto, apenas o isolado A5 apresentou degradação visível do papel de filtro, apesar de ainda permanecerem intactos. Além disso, a área de maior degradação observada foi aquela em que o papel de filtro não estava submerso no meio de cultura. Já isolado A7 apresentou crescimento no papel de filtro, mas sem aparente degradação. Os resultados aos dez dias de incubação podem ser observados na Figura 14.

O meio 2, que possuía sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, promoveu menor crescimento dos isolados comparado ao meio 1. Esse efeito foi mais evidente para os isolados A3, A7 e B9. O isolado A5 apresentou crescimento razoável. Além disso, não foi observada degradação do papel de filtro com nenhum dos isolados

testados neste meio. O crescimento dos microrganismos testados aos dez dias de incubação pode ser observado na Figura 15.

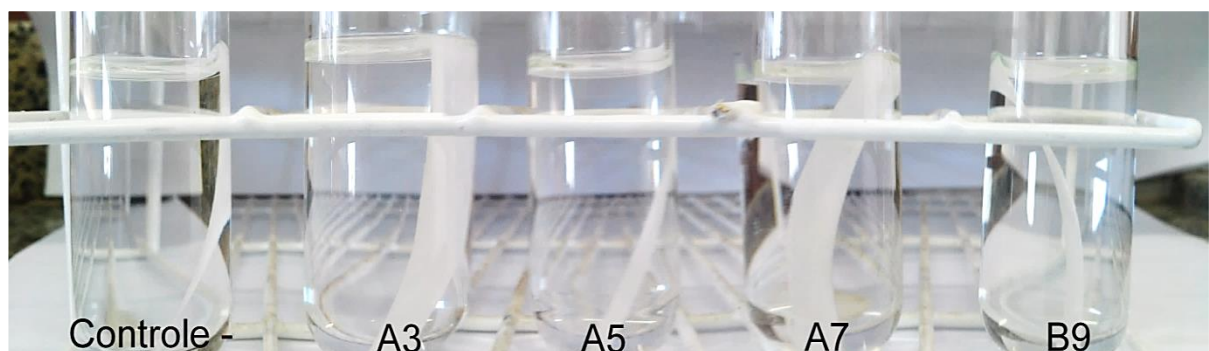
Conforme observado, o meio 1, que continha hidrolisado enzimático de caseína, favoreceu o crescimento dos isolados testados com relação ao meio 2. Isso pode ter ocorrido devido à presença de aminoácidos e peptídeos presentes no hidrolisado enzimático de caseína, que podem ser usados como fonte de carbono e energia. Isto indica que o crescimento dos isolados pode não ter ocorrido devido à utilização do papel de filtro. Entretanto, o isolado A5 apresentou crescimento observável no meio 2, mostrando que esta bactéria é capaz de utilizar a celulose do papel de filtro como fonte de carbono e o nitrogênio em forma de amônio para a síntese de todos os componentes necessários ao crescimento.

Figura 14 - Crescimento dos isolados A3, A5, A7 e B9 e controle negativo em meio de cultura líquido (meio 1) com papel de filtro como fonte principal de carbono e energia aos 10 dias de incubação.



Fonte: o autor (2017)

Figura 15 - Crescimento dos isolados A3, A5, A7 e B9 e controle negativo em meio de cultura líquido (meio 2) com papel de filtro como fonte de carbono e energia aos 10 dias de incubação.



Fonte: o autor (2017)

Estes resultados sugerem potencial para o uso de resíduo celulósico como substrato e fonte de carbono para o crescimento do isolado A5, o microrganismo que apresentou maior versatilidade enzimática entre todos os isolados.

5.4.3.2 Teste 2

Com base nos resultados observados no teste 1, os isolados A5 e A3 foram selecionados para a realização de um segundo teste de degradação de papel de filtro. Neste teste, os papéis de filtro ficaram aproximadamente 50% submersos no meio de cultura. Além disso, foram utilizados outros dois meios, um completamente sintético (meio 3) e outro semissintético (meio 4).

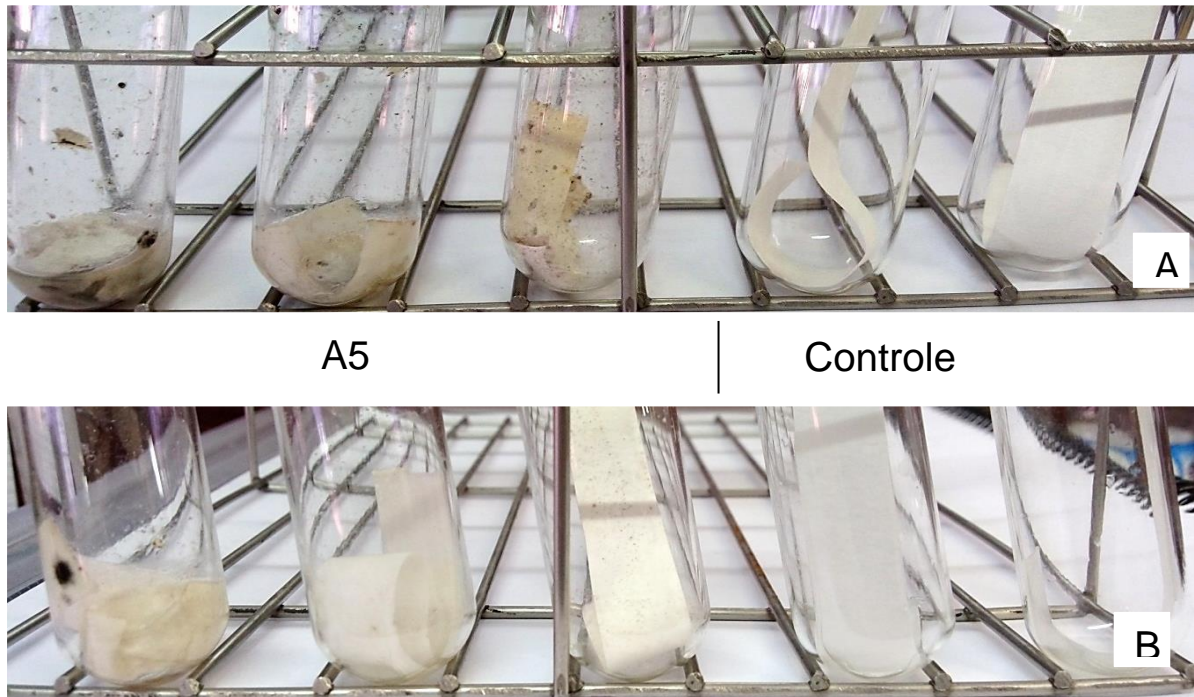
Após 50 dias de incubação, foi constatada degradação evidente do papel de filtro pelo isolado A5 e nenhum efeito significativo pelo isolado A3. O crescimento do isolado A5 se deu inicialmente pela formação de micélios brancos que ficaram acinzentados com o passar do tempo. Além disso, foi observado maior crescimento do isolado A5 nas áreas do papel de filtro que não estavam submersas. Isso pode indicar que o crescimento neste tipo de substrato (papel de filtro) é favorecido por condições de menor perturbação mecânica (solução aquosa com relação ao ar), pois é possível que as colônias do isolado A5 possuam maior dificuldade de se fixarem ao papel submerso no meio de cultura. Outra possibilidade é que a maior concentração de oxigênio da fração gasosa tenha estimulado o crescimento do A5, pois se trata de uma bactéria aeróbica com metabolismo oxidativo, conforme observado nos testes de catalase e de fermentação ácida.

Estudos investigando a capacidade celulolítica de diferentes espécies de bactérias já foram publicados. Ramin et al. (2008), por exemplo, observaram que cepas de *Chryseobacterium kwangyangense* e *Bacillus cereus* são capazes de crescer em meio mineral suplementado com papel de filtro como única fonte de carbono. Já Han e Srinivasan (1968) foram capazes de isolar do solo de campos de cana-de-açúcar uma bactéria do gênero *Cellulomonas* capaz de degradar, em 5 dias, papel de filtro com 55% de eficiência e bagaço de cana-de-açúcar tratado com álcali com até 80% de eficiência.

Comparando-se os dois meios utilizados, é possível afirmar que o extrato de levedura estimulou o crescimento do isolado A5, que apresentou maior degradação do papel de filtro no meio com suplementação do extrato de levedura, provavelmente em razão das vitaminas fornecidas por esse, que funcionam como

fatores de crescimento. A degradação causada pelo isolado A5 ao papel de filtro teste 2 pode ser observada nas Figura 16.

Figura 16 - Degradação de papel de filtro por ação da bactéria A5 após 50 dias de incubação em meio semissintético (A) e meio sintético (B).



Fonte: o autor (2017)

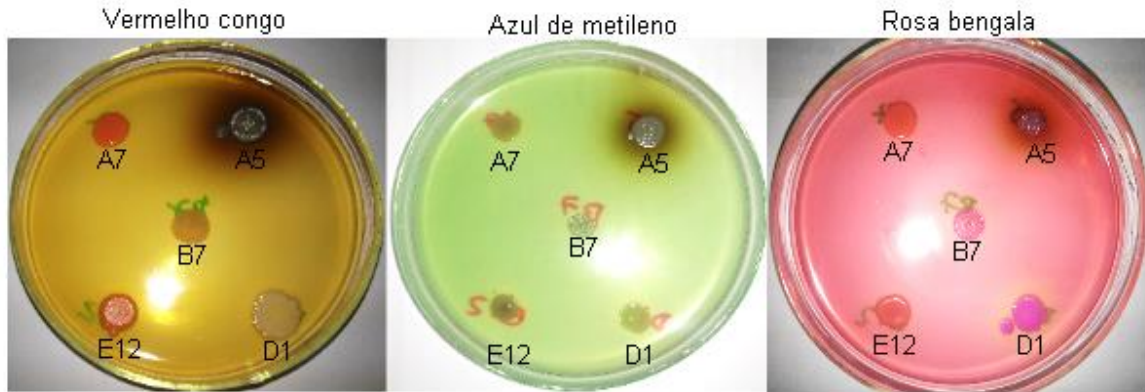
A utilização de resíduos celulolíticos como substrato para o crescimento de microrganismos é muito vantajosa devido à alta disponibilidade e ao baixo preço. Um dos exemplos seria a utilização das toneladas de casca de coco-verde destinadas ao descarte como substrato barato para o crescimento de microrganismos de interesse biotecnológico, tal como o isolado A5. Além disso, a possibilidade de cultivo de microrganismos celulolíticos em conjunto com não celulolíticos aumenta ainda mais as possibilidades para a utilização deste tipo de substrato. Por exemplo, Gupta, Samant e Sahu (2012) observaram a produção de etanol a partir de papel de filtro ao incubarem bactérias celulolíticas em conjunto com a levedura *S. cerevisiae*.

5.4.4 Descoloração dos corantes vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala

5.4.4.1 Meio sólido

O crescimento dos isolados testados e atividade descolorante aos cinco dias de incubação podem ser vistos na Figura 17.

Figura 17 - Crescimento e atividade descolorante das bactérias A5, B7 e D1 e das leveduras A7 e E12 em meio sólido contendo os corantes vermelho congô, azul de metileno e rosa bengala observados no 5º dia de incubação.



Fonte: o autor (2016)

5.4.4.1.1 Vermelho congô

Todos os isolados foram capazes de crescer no meio com a concentração de vermelho-congô utilizada (10 mg/L). Entretanto, esta concentração de corante não possibilitou uma diferenciação muito eficiente quanto à descoloração realizada pelos isolados. Apesar disto, ao final do período de teste (12 dias) os isolados A7, B7 e D1 apresentaram zonas perceptíveis de descoloração. O isolado A5 apresentou produção de pigmento extracelular característico, o que dificultou a visualização de zona de descoloração, enquanto que o isolado E12 se apresentou pouco eficiente na descoloração de vermelho-congô. Foram calculados índices de descoloração para os isolados que produziram zonas de coloração distinguíveis (Figura 18). Nenhum dos isolados aparentou adsorver o corante, pois não houve mudança de coloração aparente em nenhum das colônias.

5.4.4.1.2 Azul de metileno

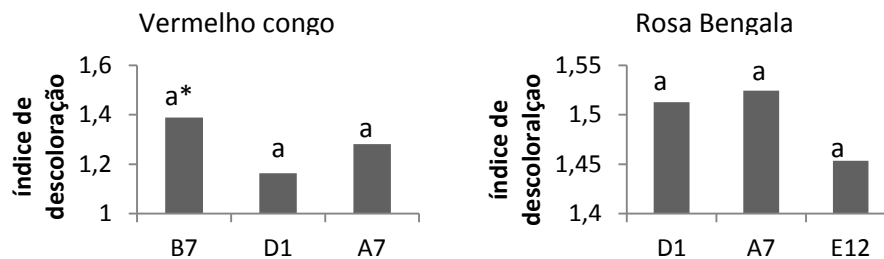
Todos os isolados foram capazes de crescer e produzir alguma zona de descoloração com formação de zonas amareladas, em contraste com a coloração esverdeada do meio de cultura. Entretanto, nenhum dos isolados apresentou zonas de descoloração com bordas delimitadas o suficiente para o cálculo de índices de descoloração. Deste modo, foi registrada apenas a ordem de descoloração observada visualmente, sendo A5, A7, D1, E12 e B7 (ordem decrescente). Além

disso, os isolados E12, A7, B7 e D1 apresentaram característica adsorção do corante (mudança de coloração das colônias para azul/verde).

5.4.4.1.3 Rosa bengala

Todos os isolados foram capazes de crescer. Ao final do período de 12 dias de avaliação, os isolados D1, A7 e E12 apresentaram zonas de descoloração claras o suficiente para que o índice de descoloração fosse medido (Figura 18). O isolado B7 apresentou reação positiva, mas menos evidente, enquanto que a produção de pigmento extracelular pelo isolado A5 impossibilitou a avaliação de atividade por este isolado. Os isolados A5, B7, D1 e E12 apresentaram mudança de coloração nas colônias, o que é indicativo de adsorção do corante pelas células.

Figura 18 - Índices de descoloração de vermelho congo e rosa bengala após 12 dias de incubação.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Skott-knott (vermelho congo) e de Tukey (rosa bengala) a 95% de probabilidade.

Fonte: o autor (2017)

De acordo com a análise de índice de descoloração, não houve diferença estatisticamente significativa entre as zonas de descoloração exibidas pelos isolados. A capacidade de determinados microrganismos de descolorir corantes é muitas vezes associada à produção de enzimas oxidativas, tais como lacases, lignina peroxidases, manganês peroxidases, entre outras (SAPARRAT et al., 2008; MADHAVI; LELE, 2009; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Saparrat et al. (2008) estudaram a degradação de diversos corantes (incluindo rosa bengala, vermelho do congo e azul de metileno) em meio sólido pelo fungo *Grammothele subargentea* e encontraram que não houve descoloração do azul de metileno, enquanto que o vermelho-congo e o rosa bengala foram descoloridos completamente após 7 dias de incubação, o que foi relacionado ou à

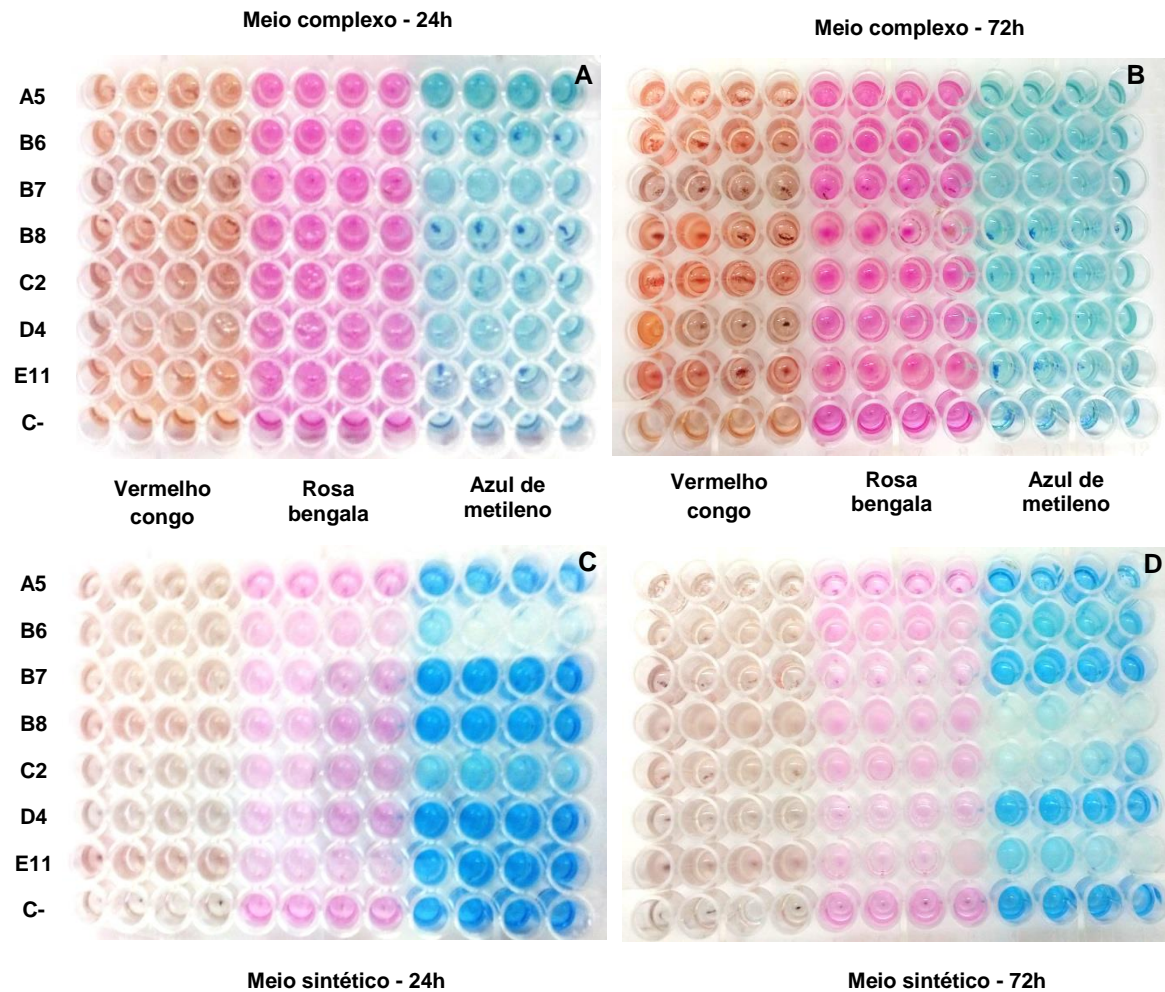
adsorção micelial ou à biotransformação, especialmente por atividade da enzima lacase.

A adsorção por parte das células pode ter tido papel significativo para a descoloração dos corantes azul de metileno e rosa bengala, especialmente pelos isolados B7 e D1, que apresentaram o crescimento de colônias com a coloração do corante no meio. Esta pode ser uma característica interessante do ponto de vista de remoção de corantes de efluentes, especialmente se as linhagens em questão forem não patogênicas e resistentes a altas concentrações de corantes, o que viabilizaria seu uso em plantas de tratamento de efluentes contendo estes corantes.

5.4.4.2 Meio líquido

Levando em conta os resultados obtidos no teste de descoloração em meio sólido e os resultados de atividade de polifenoloxidasas (oxidação de ácido gálico), os isolados A5, B6, B7, B8, C2, D4 e E11 foram selecionados para os testes de descoloração de vermelho congo, azul de metileno e rosa bengala em meio líquido. Neste caso, foram testados dois meios distintos, um complexo (NYD) e um sintético (M3+glicose) com o respectivo corante a ser degradado (APÊNDICE) a fim de se avaliar o desempenho dos isolados em diferentes condições nutricionais. Os resultados na mudança de coloração dos meios com corantes após 24 e 72h de incubação podem ser observados na Figura 19.

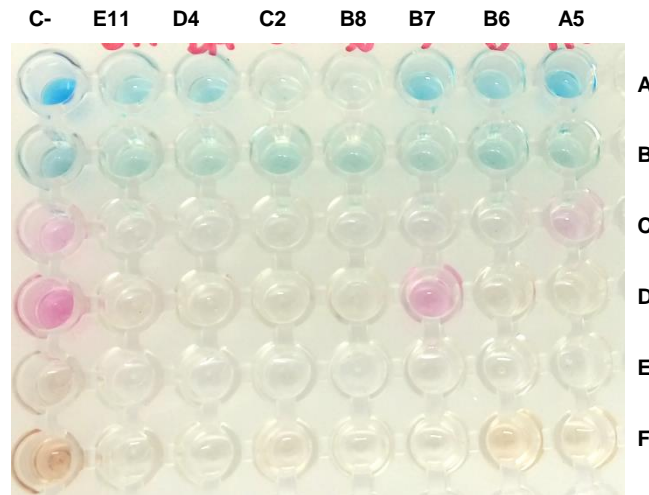
Figura 19 - Descoloração dos corantes vermelho congo, rosa bengala e azul de metileno após 24 (A e C) e 72h (B e D) de incubação a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com os isolados A5, B6, B7, B8, C2, D4 e E11 em meio de cultura líquido complexo (A e B) e sintético (C e D).



Fonte: o autor (2017)

Para verificar se os isolados haviam absorvido ou adsorvido o corante, o sobrenadante das culturas foi avaliado visualmente quanto à intensidade de coloração remanescente comparada ao controle positivo após 72h de incubação (Figura 20).

Figura 20 - Sobrenadante livre de células das culturas dos testes de descoloração observados após 72h de incubação a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em meio líquido sintético (A, C e E) e complexo (B, D, e F) na presença de azul de metileno (A e B), rosa bengala (C e D) e vermelho congo (E e F). C-: controle negativo.



Fonte: o autor (2017)

5.4.4.2.1 Vermelho congo

Após 24h de incubação, os isolados B8, E11 e A5 alteraram a coloração do meio sintético de amarronzado, quase preto, para avermelhado. Reação semelhante foi observada para o isolado B7 após 48h de incubação. Estes resultados se mantiveram inalterados até o período final de avaliação (72h).

Quando crescidos em meio complexo, todos os isolados exibiram formação de precipitado após 24h de incubação, fato não observado para o controle negativo. Os isolados B7 e D4 apresentaram descoloração evidente, enquanto que B6, C2 e E11 mudaram a coloração de alaranjado para avermelhado. Após 48h de incubação, os isolados A5 e B8 mostraram reações semelhantes. Outras alterações não foram observadas até o final do período de avaliação (72h).

A eficiência na descoloração de corantes pode variar de acordo com as condições nutricionais do meio (CRIPPS; BUMPUS; AUST,1990). Neste caso, os isolados B7 e D4 apresentaram melhor capacidade de descoloração quando crescidos em meio complexo, rico em nutrientes. A partir da Figura 20 pode ser observado que o sobrenadante das culturas destes isolados apresenta-se levemente amarelado, quase transparente, diferente da cultura na presença de células (Figura 19B). Tais observações permitem concluir que houve retenção do corante por parte das células crescidas em meio complexo. Estes resultados corroboram com os

observados por Cripps, Bumpus e Aust (1990). Estes pesquisadores investigaram a capacidade do fungo *Phanerochaete chrysosporium* de degradar os corantes Azure B, Tropaeolina O, Orange II e Vermelho congo em meio sintético com e sem limitação de nitrogênio e descobriram que os corantes eram degradados mais rapidamente e em maior percentagem em condições de limitação de nitrogênio, enquanto que as culturas crescidas sem limitação de nitrogênio removiam o corante por adsorção micelial. Neste estudo, os autores relacionaram a maior degradação observada para o meio com limitação de nitrogênio à chegada da fase estacionária do fungo e produção de enzimas lignolíticas, tais como ligninas peroxidases e outras não identificadas pelo estudo.

A descoloração do corante azo vermelho congo em meio líquido complexo já foi estudada para *Pseudomonas* sp. SU-EBT por Telke et al. (2010). Estes pesquisadores isolaram esta bactéria a partir de solo do local de descarte de efluente de uma indústria de coloração têxtil. A descoloração eficiente de 100 ppm de corante foi usada como critério para seleção dos isolados com potencial de descoloração. Portanto, pode-se afirmar que os isolados testados no presente trabalho possuem potencial de descoloração visto que foram capazes de descolorar vermelho congo na concentração de 280 ppm, quase três vezes maior que a utilizada por Telke et al. (2010), tendo em vista que o isolado obtido por estes autores se mostrou capaz de degradar e detoxificar eficientemente (90%) o vermelho-congo em altas concentrações (até 1000 ppm) ao ser incubado em caldo nutriente contendo o corante. Esta mesma linhagem foi capaz de descolorar eficientemente (90-97%) uma gama de corantes de diversas classes, além de uma mistura de corantes. Neste estudo, a atividade de lacase intracelular foi relacionada aos primeiros estágios de descoloração de vermelho-congo.

5.4.4.2.2 Rosa bengala

Após 24h de incubação em meio sintético, os isolados B6, B7, B8, C2, D4 e E11 apresentaram leve descoloração, enquanto que o A5 apresentou crescimento de colônias róseas, mas sem efeito aparente na coloração do meio. Após 72h de incubação, todos os isolados testados, exceto o A5, apresentaram redução na intensidade de coloração em comparação com o controle negativo, destacando-se os isolados B7 e D4, pois não apresentaram turvação do meio, indicando baixa

concentração de células. Isto significa que a capacidade de descoloração foi suficientemente alta para ser percebida mesmo a baixas concentrações celulares.

Após 72 h de incubação, todos os isolados apresentaram crescimento em meio complexo, não sendo observada redução significativa de coloração em comparação com o controle negativo. Duas possibilidades podem explicar tal fato. A primeira é que, apesar de terem crescido, os isolados não conseguiram degradar eficientemente o corante. A segunda é que as células foram apenas capazes de absorver ou adsorver o corante, removendo-o da solução, mas sem alteração aparente na coloração da devido à presença dos corantes nas células. Ao se observar a Figura 20, pode-se afirmar que a segunda explicação é mais plausível, visto que o sobrenadante da maioria das culturas se apresentou transparente.

A remoção de rosa bengala por adsorção celular, conforme observada neste trabalho já foi relatada na literatura. Purewal (2014) investigou a degradação de rosa bengala por uma linhagem de *Aspergillus awamori* e encontrou que o máximo de remoção do corante (>99%) era alcançado aos 10 dias de incubação numa combinação de três dias de incubação estática e sete dias de incubação com agitação. Neste caso, foi observado que grande parte da remoção pelo fungo ocorria por adsorção micelial.

Jaidev, Narasimha e Saigopal (2010) investigaram a remoção de rosa bengala do meio líquido por uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada de solo contaminado com efluente de indústria de coloração têxtil e observaram descoloração completa dentro de 24h quando a concentração do corante era de 100ppm, mas quando foi aumentada para 200 ppm a eficiência de remoção diminuiu para cerca de 80% em 3 dias de incubação e foi de 300 ppm, nenhuma remoção foi observada, o que demonstra os efeitos tóxicos do corante para o fungo em questão. Neste caso, a remoção inicial também foi atribuída à adsorção por parte do micélio do fungo. Tais resultados concordam com os obtidos neste trabalho, visto que foi utilizada concentração semelhante de corante (90 ppm) e foi observada remoção por mecanismo similar.

A capacidade de remoção de corantes por parte de bactérias também já foi investigada por alguns autores. Por exemplo, Khan e Mathur (2015) isolaram bactérias de efluentes da indústria têxtil e determinaram sua atividade de remoção de diversos corantes. Neste estudo, cinco isolados apresentaram alta capacidade de remoção de vermelho-congo, rosa bengala, verde malaquita e alaranjado de metila

em concentrações variando entre 10 a 50 ppm, sendo observada descoloração máxima de 75,75% para o corante rosa bengala na concentração de 20 ppm. Esta concentração foi 4,5 vezes menor que a utilizada neste trabalho, o que indica bom potencial de remoção, especialmente dos isolados E11, D4, C2 e B8, que apresentaram remoção nos dois tipos de meios testados.

5.4.4.2.3 Azul de metileno

Após 24h de incubação em meio sintético, os isolados B6 e C2 apresentaram descoloração quase completa, já o isolado A5 apresentou pontos de descoloração localizada abaixo das colônias. Após 48h de incubação, o isolado B8 também apresentou descoloração quase completa, enquanto que o isolado E11 apresentou leve descoloração. Após 72h de incubação, os isolados B8, C2 e E11 apresentaram descoloração mais visível, enquanto que a coloração dos poços com isolado B6 aparenta ter sido revertida de incolor para azul entre 48h e 72h de incubação. Os isolados B7 e D4 apresentaram leve descoloração, enquanto que A5 apresentou descoloração localizada.

O comportamento de reversão da coloração observado para o isolado B6 já foi observado num estudo realizado por Ong et al. (2005), que investigaram a descoloração do azul de metileno por um reator de lodo ativado. Estes pesquisadores observaram que a solução descolorida que saía no início do reator voltava a ficar azulada quando exposta ao ar por determinado período de tempo. A explicação proposta por eles foi que os microrganismos oxidavam a matéria orgânica presente no meio (sacarose e peptona) tendo o azul de metileno como acceptor de elétrons, passando para a forma reduzida, que é incolor. Ao ficar em contato com o oxigênio do ar, o azul de metileno era novamente oxidado, tornando a solução novamente azulada. Este pode ter sido o caso para o isolado B6, que pode desacelerado a atividade metabólica com o passar do tempo, permitindo a oxidação do azul de metileno.

Após 24h de crescimento em meio complexo, nenhuma mudança na coloração foi detectada por parte de nenhum dos isolados. Entretanto, foi observado que os isolados B7, D4 e A5 diminuíram a quantidade de corante precipitado se comparado ao controle negativo. Esta tendência foi observada após 48h e 72h de incubação.

Alguns estudos relacionam a capacidade de descoloração do azul de metileno à produção de enzimas lignolíticas, como lignina peroxidase e manganês peroxidase. Por exemplo, Dey, Maiti e Bhattacharyya (1994) investigaram a capacidade de descoloração dos corantes vermelho congo e azul de metileno bem como a produção de enzimas pelos fungos *Polyporus ostreiformis* e *Polyporus chrysosporium* e encontraram que *P. ostreiformis* foi mais eficiente na descoloração dos corantes que *P. chrysosporium*, fato esse relacionado à secreção de maiores níveis de manganês peroxidases.

De acordo com a Figura 20, é possível observar que nenhum dos isolados produziu mudança significativa na coloração dos sobrenadantes do meio complexo, enquanto que os isolados C2 e B8 produziram sobrenadantes incolores e os isolados A5, B6, B7, D4 e E11 produziram sobrenadantes com coloração levemente diferente do controle para o meio sintético.

Com base no que foi observado, pode-se inferir que a descoloração do azul de metileno pelos isolados B8 e C2 em meio sintético não ocorreu em razão de adsorção ou absorção celular, pois ao final da incubação, o meio não apresentou crescimento de células azuladas. Portanto, é possível que estes isolados possuam a capacidade de produzir enzimas capazes de degradar o azul de metileno, tais como ligninas peroxidases e manganês peroxidases, fato que deve ser investigado posteriormente.

5.5 Análise do Potencial Biotecnológico dos Isolados

O potencial biotecnológico das bactérias e leveduras isoladas neste trabalho pode ser observado nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 – Potencial biotecnológico das bactérias isoladas.

Bactéria	CMCases	Avicelases	Amilases (1%)	Amilases (0,2%)	Pectinases	Xilanases	Proteases	Lipases/ Esterases	Lacase	Polifenoloxidasases	Tirosinase	DNases	Crescimento em 5% de NaCl	Crescimento em 10% de NaCl	Crescimento em 15% de NaCl
A1	4,14	-	-	-	-	±	6,17	-	-	-	-	1,65	+	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-	+	-	-	+	-	-
A3	5,10	-	-	-	-	±	4,37	-	-	+	-	1,76	ND	ND	ND
A5	3,23	1,74	2,80	3,60	3,47	3,58	1,34	2,00	-	+	+	2,11	+	-	-

Tabela 9 – continuação...

A8	3,47	-	-	-	-	±	2,05	-	-	-	-	2,34	+	-	-
B1	4,92	+	-	-	-	±	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
B2	1,75	+	-	-	-	±	±	-	-	+	ND	ND	+	-	-
B3	3,64	+	-	-	-	+	+	-	ND	-	ND	ND	+	-	-
B7	-	-	-	2,78	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B9	3,17	~1	-	-	-	<1	-	-	-	+	-	1,65	+	-	-
B11	3,90	-	-	±	-	-	+	-	ND	+	ND	-	+	-	-
D1	1,78	1,87	-	-	-	-	1,58	-	-	+	-	1,17	+	+	-
D2	-	-	1,16	-	-	1,91	-	-	ND	+	-	-	-	-	-
D4	1,71	~1	-	1,81	-	~1	1,08	-	ND	+	-	1,39	+	-	-
D6	2,07	-	-	-	-	-	2,07	-	ND	+	-	1,60	+	-	-

- : resultado negativo, + : resultado positivo, ± : resultado positivo fraco, ND : não determinado.

Fonte: o autor (2016)

O isolado A5 se destacou em termos de potencial biotecnológico, pois apresentou atividade para todas as enzimas testadas, exceto lacases, e apresentou tolerância a 5% (m/v) de NaCl. Além disso, dos nove valores de índices enzimáticos determinados, o isolado A5 apresentou IE com valor superior a 2,5 em cinco. Isto demonstra que se trata de uma bactéria bioquimicamente versátil, capaz de hidrolisar celulose, amido, lipídeos, pectina, xilano e DNA através da produção de diferentes enzimas extracelulares. Além disso, possui atividade de tirosinase, o que indica sua possível capacidade de degradação da lignina (GOTTLIEB; PELCZAR JR., 1951; VARNAITE et al., 2011). As características bioquímicas do isolado A5 o tornam um candidato apropriado à degradação da casca do coco-verde, visto que esta linhagem bacteriana é capaz de produzir celulasas, hemicelulasas e tirosinases, enzimas envolvidas respectivamente na degradação de celulose, hemicelulose e lignina, os principais componentes da casca de coco-verde (ISRAEL et al, 2011; CORRADINI et al. 2009). Isto torna o A5 especialmente atrativo no que se referem a aplicações práticas, tais como produtor de enzimas em escala industrial ou acelerador biológico em processos de compostagem, por exemplo.

Os isolados A1, A3, A8, B1, B3, B9, B11 e D6 se destacaram com respeito à produção de CMCase, demonstrando potencial de aplicação na degradação ou sacarificação de biomassa rica em celulose, por exemplo. O isolado D1 se destacou pela produção de avicelases e poderia ser aplicado em conjunto com os isolados citados anteriormente para melhor aproveitamento da biomassa celulósica. Além

disso, os isolados A3, B9, B11 e D6 também apresentaram escurecimento em meio com ácido gálico, um indicativo da produção de enzimas geralmente envolvidas na despolimerização oxidativa de lignina (GOTTLIEB; PELCZAR JR., 1951). Portanto, tais características indicam que estes isolados são apropriados à degradação ou utilização de resíduos ricos em celulose e lignina como fonte de carbono e energia.

Os isolados B7 e D2 se destacaram na produção de amilases, o que indica potencial para uso como produtores desta enzima em escala industrial ou como microrganismos degradadores de resíduos amilósicos. Já o isolado D1 foi o único que apresentou crescimento em meio com 10% de NaCl, além de apresentar atividade de proteases e avicelases. Como se trata de um isolado com maior halotolerância, é possível que suas enzimas também exibam esta característica, o que as torna mais atrativas do ponto de vista biotecnológico. Por exemplo, proteases halotolerantes possuem aplicação em diversos setores da indústria, tais como na fermentação em condições salinas ou como aditivos em detergentes, já que muitas exibem também alcalotolerância (SETATI, 2010).

Tabela 10 – Potencial biotecnológico das leveduras isoladas.

Levedura	CMCases	Avicelases	Amilases (1%)	Amilases (0,2%)	Pectinases	Xilanases	Proteases	Lipases/ Esterases	Lacase	Polifenoloxídases	Tirosinase	DNases	Crescimento em 5% de NaCl	Crescimento em 10% de NaCl	Crescimento em 15% de NaCl
A6	-	-	-	-	-	-	<1	-	-	-	-	-	+	+	+
A7	-	1,27	-	-	-	-	2,39	-	-	-	-	-	+	+	±
B4	-	-	-	-	-	<1	2,44	-	-	-	-	-	+	+	+
B6	-	-	-	<1	-	<1	+	1,51	-	+	-	+	+	+	±
B8	-	-	-	<1	1,73	1,33	2,36	1,82	-	-	-	+	+	+	-
B10	-	-	-	2,97	2,62	1,38	-	2,08	-	-	-	1,64	+	+	-
C1	-	1,65	-	-	-	<1	1,14	-	-	+	-	-	+	+	+
C2	-	-	-	<1	-	-	2,86	1,37	-	+	-	ND	+	+	+
C5	-	-	-	±	ND	+	-	-	-	±	ND	ND	+	+	+
C6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
C7	-	-	-	-	-	<1	-	-	-	+	-	-	+	+	±
C10	-	-	-	-	-	<1	-	-	-	+	-	-	+	+	+
D3	-	-	-	-	-	±	-	1,39	ND	+	-	-	+	+	+
D5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
E1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+

Tabela 10 – continuação...

E2	-	-	-	<1	-	<1	-	1,08	-	+	-	-	+	+	+
E4	-	-	2,20	2,01	1,17	2,57	1,73	5,70	-	-	-	-	+	+	-
E7	-	-	-	-	-	<1	-	1,40	-	+	-	-	+	+	+
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	+	+
E10	-	-	-	<1	1,42	1,52	-	4,60	-	+	-	+	+	+	-
E11	-	-	-	-	1,23	1,30	-	5,10	-	+	-	+	+	+	-
E12	-	-	-	-	-	<1	2,10	-	-	+	-	+	+	±	-
E13	-	-	-	-	-	-	-	1,50	-	+	-	-	+	+	+

- : resultado negativo, + : resultado positivo, ± : resultado positivo fraco, ND : não determinado

Fonte: o autor (2016)

Em termos de índice enzimático, a produção de lipases/esterases e de proteases por parte das leveduras teve maior destaque, pois apresentaram os maiores de valores de IE. Considerando-se a matriz de isolamento, estes dados são surpreendentes, pois proteínas (19 %) e lipídeos (1,7%) são encontrados na casca de coco-verde em concentrações muito inferiores em relação aos carboidratos (75,23%) (NERY et al., 2013).

A halotolerância é uma característica contrastante entre leveduras e bactérias isoladas. As leveduras apresentaram halotolerância superior, tanto em número de isolados quanto em termos de concentração de NaCl tolerada. Isto as torna interessantes do ponto de vista biotecnológico, já que os usos de linhagens de microrganismos halotolerantes para diferentes processos têm sido bastante estudados (KANDASAMY et al., 2012; ZAKY et al., 2014).

O isolado E4 foi o que mais se destacou quanto à versatilidade bioquímica, pois apresentou a capacidade de produzir amilases, pectinases, xilanases, proteases e lipases/esterases, apresentando valores de IE superiores a 2 para todas exceto proteases e pectinases. Além disso, apresentou tolerância a 10% de NaCl. Portanto, de modo semelhante à bactéria A5, a levedura E4 possui potencial para a aplicação em diversos setores. Por exemplo, poderia ser usada na sacarificação de resíduos ricos em amido ou pectina, além de tratamento de resíduos ricos em proteínas e/ou gorduras, mesmo em altas condições de salinidade. Por se tratar de uma levedura, o potencial fermentativo também pode ser explorado. Os isolados C2 e B8 se mostraram eficientes nos testes iniciais de remoção de corantes, o que demonstra potencial para a biorremediação de efluentes contaminados.

5.6 Identificação dos Isolados por MALDI-TO

Como parte de utilização de uma tecnologia relativamente recente para a identificação de microrganismos, a técnica de MALDI-TOF foi utilizada como ferramenta na tentativa de identificação dos isolados.

A resolução dos espectros obtidos não foi suficientemente alta para que se obtivessem identificações confiáveis para a maioria dos isolados. Entretanto, alguns puderam ser identificados a nível de gênero. Os isolados com score entre 1,700 e 1,999 (identificação provável a nível de gênero) foram: A6 (*Pichia* sp.), A7 (*Rhodotorula* sp.), B9 (*Pantoea* sp.), D1 (*Bacillus* sp.), D6 (*Pantoea* sp.), D4 (*Pantoea* sp.), B7 (*Arthrobacter* sp.) e B10 (*Cryptococcus* sp.).

O MALDI-TOF é uma técnica que pode ser usada para a identificação rápida microrganismos. Muitos estudos tem feito uso desta técnica para a identificação de isolados de importância clínica num período de tempo mais curto que as baseadas em provas bioquímicas e fisiológicas ou PCR (NEVILLE et al., 2011; SENG et al., 2013). Além do mais, diversos pesquisadores têm utilizado desta técnica para a identificação de microrganismos ambientais, contribuindo para tornar esta técnica aplicável a amostras de diferentes nichos (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013).

A validação da identificação dos microrganismos deve ser feita por sequenciamento de regiões de 16S rDNA para bactérias e ITS do DNA nuclear (nrDNA) para leveduras.

5.7 Voláteis Produzidos por Culturas Puras

Para a análise de voláteis produzidos pelos microrganismos isolados em cultura pura, quatro isolados foram selecionados, sendo duas bactérias (A5 e D1) e duas leveduras (E4 e D5). A escolha de dois isolados pertencentes aos dois tipos de microrganismos foi feita propositadamente a fim de se observar possíveis diferenças na produção de voláteis por bactérias e leveduras.

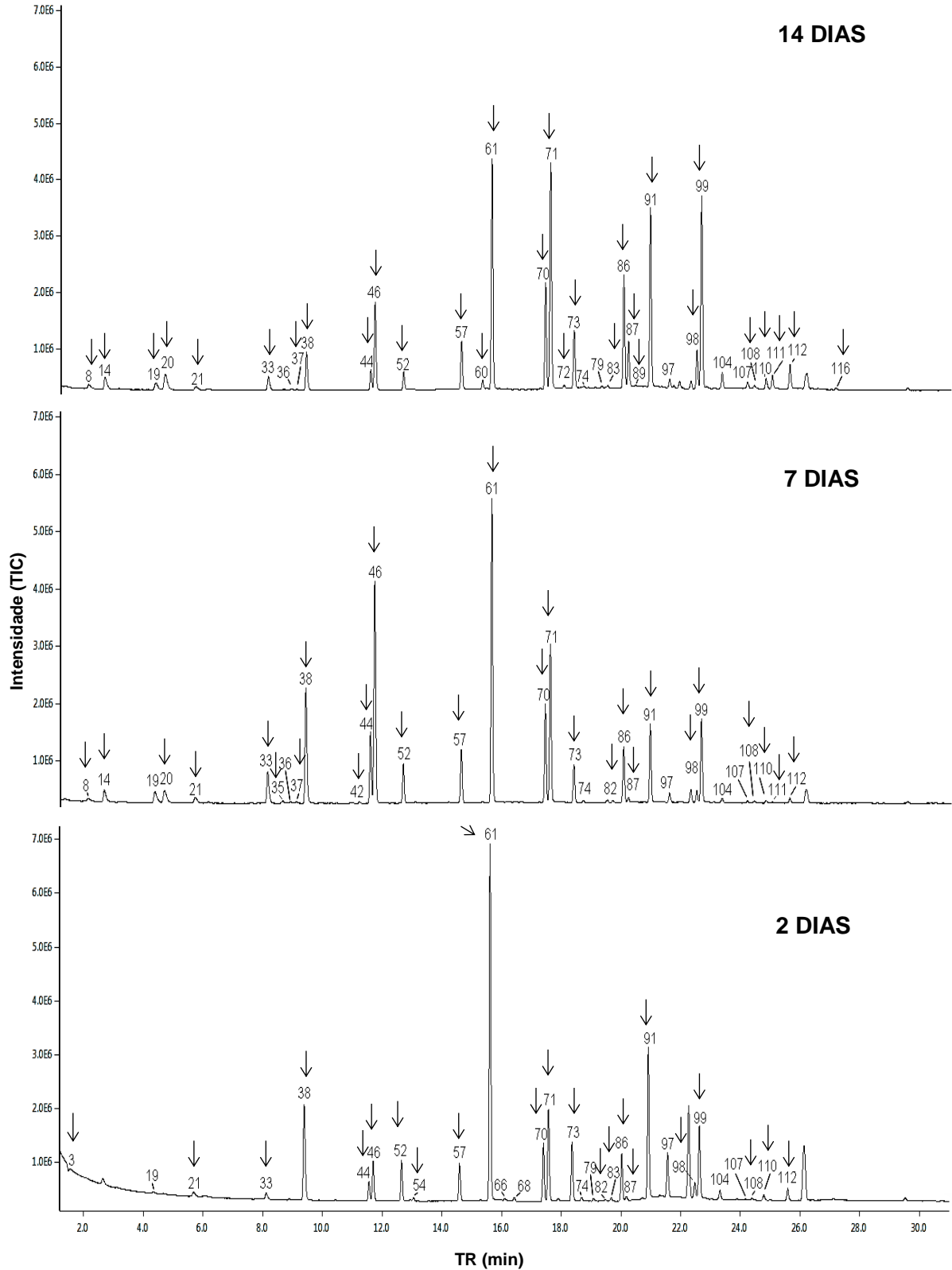
Como não foram observados ácidos carboxílicos ou ésteres dentre os voláteis emitidos pela fermentação da casca do coco-verde, o teste de produção de ácido em meio de cultura foi utilizado como um dos critérios para a seleção dos isolados. Os isolados A5, D1 e E4 não apresentaram fermentação ácida em meio líquido e por isso foram selecionados. Os outros dois critérios utilizados foram a produção de celulases, xilanases e polifenoloxidasas e a halotolerância. O isolado D5 foi

selecionado por apresentar características diferentes dos outros isolados selecionados, a fim de se observar possível diferença no perfil de voláteis emitidos.

Em termos gerais, a produção de voláteis foi quantitativa e qualitativamente mais abundante para as bactérias testadas. Além disso, foi observado que o período de incubação dos isolados influenciou na produção de alguns compostos. Os voláteis produzidos pelas culturas puras, bem como pelo meio NYDAm estéril (controle negativo), foram reunidos em uma única tabela e os picos numerados para fins de comparação. Portanto, picos com a mesma numeração, mas em cromatogramas diferentes, correspondem ao mesmo composto observado.

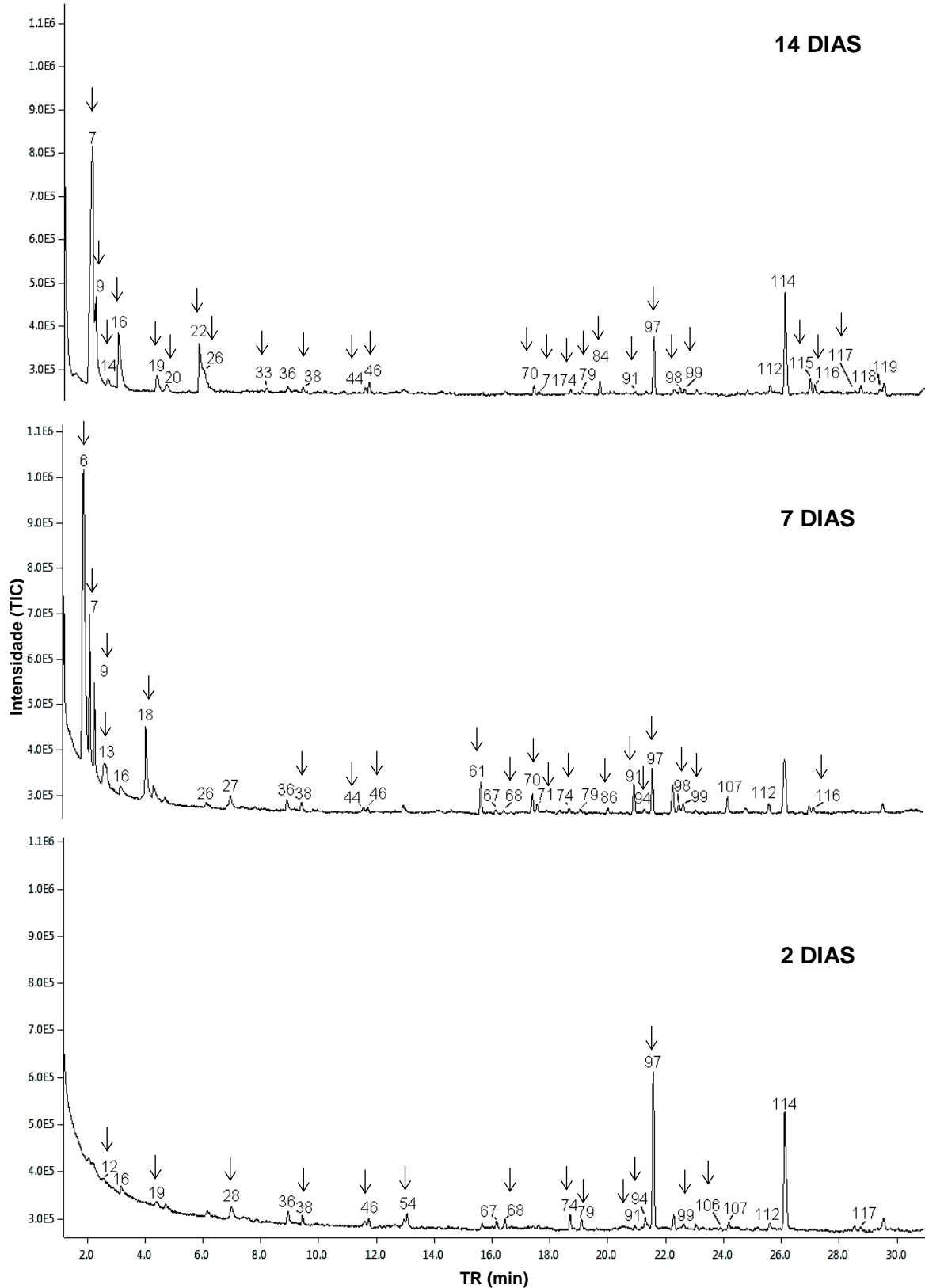
Como o perfil de produção de voláteis de bactérias foi visivelmente distinto do das leveduras, os resultados foram divididos em voláteis de bactéria e de leveduras. Os cromatogramas correspondentes à análise dos voláteis produzidos pelas bactérias A5 e D1 podem ser observados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 21 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado A5 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32 °C. Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados em concentração pelo menos duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).



Fonte: o autor (2017)

Figura 22 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado D1 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C. Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou com concentração pelo menos duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).



Fonte: o autor (2017)

Os voláteis produzidos pelas culturas puras dos isolados A5 e D1 estão relacionados na Tabela 11.

Tabela 11 - Compostos tentativamente identificados por CG-EM do *headspace* de culturas das bactérias A5 e D1 em 2, 7 e 14 dias de incubação.

pico	TR (min)	Composto ¹	IRL ²	IRL lit. ³	Quantidade do composto ⁴					
					A5			D1		
					2 ⁵	7	14	2	7	14
3	1,572	não identificado	<1000	-	2	-	-	-	-	-
6	1,894	ácido 2-etilbutanoico	<1000	-	-	-	-	-	30	-
7	2,026	ácido 3-metilbutanoico	<1000	826	-	-	-	-	3[#]	24
8	2,111	5-metil-2-hexanona	<1000	831	-	3	3	-	-	-
9	2,228	ácido 2-metilbutanoico	<1000	839	-	-	-	-	3	8
12	2,546	acetato de 3-metil-1-butila	<1000	866	-	-	-	1	-	-
13	2,600	acetato de acetoína	<1000	856	-	-	-	-	3	-
14	2,666	2-heptanona	<1000	872	-	10	8	-	-	2
16	3,127	2,5-dimetilpirazina	<1000	885	1	-	-	1	1	11
18	4,025	oxirano-2-carboxilato de etila	<1000	-	-	-	-	-	4	-
19	4,362	6-metil-2-heptanona	<1000	957	1	9	5	2	-	4
20	4,682	5-metil-2-heptanona	<1000	-	-	11	11	-	-	3
21	5,712	2-octanona	<1000	968	2	6	3	-	-	-
22	5,856	2,4,6-trimetilpiridina	<1000	976	-	-	-	-	-	7
26	6,154	2,3,5-trimetilpirazina	<1000	988	-	-	-	-	1	5
27	6,906	fenilacetaldéido	1001	1005	-	-	-	1	-	-
28	6,941	decano	1002	1000	-	-	-	1	-	-
29	6,977	5,5-dimetil-2,4-hexanodiona	1003	-	-	-	-	1	1	-
30	7,582	4-nonanona	1020	-	-	-	1	-	-	-
31	7,796	acetofenona	1026	1025.2	-	-	-	1	-	-
32	7,989	2-etilexanoato de metila	1031	-	1	1	1	-	-	-
33	8,116	7-metil-2-octanona	1035	-	3	23	12	-	-	1
35	8,614	ácido 4-metilhexanoico	1049	-	-	2	-	-	-	-
36	8,899	3-etil-2,5-dimetil-pirazina	1057	1059	1	1	2	2	2	1
37	9,077	benzoato de metila	1062	1063	1	1	2	-	-	-
38	9,398	2-nonanona	1071	1073	30	75	16	1	1	1
42	11,214	cetona não identificada	1125	-	-	1	1	-	-	-
44	11,559	8-metil-2-nonanona	1136	-	6	38	6	-	1	1
46	11,715	7-metil-2-nonanona	1141	-	11	124	25	1	1	2
52	12,656	2-decanona	1171	1171	11	25	6	-	-	-
54	13,063	aromático não identificado	1184	-	3	1	-	2	-	-
57	14,600	9-metil-2-decanona	1236	-	9	37	12	-	-	-
60	15,319	acetato de 1-octen-3-ila	1261	-	-	1	2	-	-	-

Tabela 11 – continuação...

61	15,606	2-undecanona	1271	1271.7	90	191	66	1	3	1
62	15,865	tríciclo[3.3.2.0(3,7)]decano	1280	-	1	1	1	-	-	-
64	15,980	não identificado	1284	-	-	-	1	-	-	-
66	16,124	2-(3-metilbutil)-3,5-dimetilpirazina	1289	-	1	1	1	-	-	-
67	16,153	2,5-dimetil-3-(3-metilbutil)-pirazina	1290	1295	-	-	-	1	1	-
68	16,440	tridecano	1300	1300	3	1	1	5	1	-
70	17,396	10-metil-2-undecanona	1336	-	14	61	29	-	2	1
71	17,582	9-metil-2-undecanona	1343	-	23	104	58	-	1	1
72	18,033	éster não identificado	1360	-	-	1	1	-	-	-
73	18,378	2-dodecanona	1373	1373	14	28	17	-	-	-
74	18,670	6,10-dimetil-2-undecanona	1384	-	1	2	1	9	3	1
79	19,095	tetradecano	1400	1400	2	1	1	3	1	1
82	19,492	oxigenado não identificado	1416	-	1	2	2	-	-	-
83	19,665	sesquiterpeno	1423	-	0	0	0	-	-	-
84	19,701	nerilacetona	1424	1424	-	-	-	-	-	1
86	20,037	11-metil-2-dodecanona	1438	-	3	2	1	-	1	-
87	20,186	acetato não identificado	1444	-	2	3	12	-	-	-
89	20,459	não identificado	1455	-	1	1	1	-	-	-
90	20,707	octadecano	1465	-	1	-	-	-	-	-
91	20,905	2-tridecanona	1473	1473	38	62	58	1	3	1
92	21,178	etilureia	1484	-	-	-	-	1	-	-
94	21,302	não identificado	1489	-	-	-	-	4	1	-
97	21,575	pentadecano	1500	1500	26	7	8	36	10	6
98	22,462	12-metil-2-tridecanona	1538	-	4	10	12	-	1	1
99	22,626	11-metil-2-tridecanona	1545	-	19	65	62	1	1	1
103	23,303	Não identificado	1574	-	-	-	-	1	-	-
104	23,326	2-tetradecanona	1575	1578	3	5	6	-	-	-
106	23,910	hexadecano	1600	1600	-	-	-	1	-	-
107	24,175	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil)-fenol	1612	-	1	1	4	1	2	-
108	24,396	acetato de 2-decenila	1622	-	1	2	2	-	-	-
110	24,794	13-metil-2-tetradecanona	1640	-	2	4	5	-	-	1
111	25,015	1-ciclododeciletanona	1650	-	-	1	4	-	-	-
112	25,590	2-pentadecanona	1676	1675	4	7	10	2	2	1
114	26,120	heptadecano	1700	1700	-	-	-	23	-	12
115	26,990	14-metil-2-pentadecanona	>1700	-	-	-	-	-	-	2
116	27,138	13-metil-2-pentadecanona	>1700	-	1	1	1	-	1	2
117	28,514	ftalato de diisobutila	>1700	1819	-	-	-	1	1	1
118	28,724	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	>1700	1858	-	-	-	-	-	1

Tabela 11 – continuação...

119	29,390	4-octadecil-morpholina	>1700	-	-	-	-	-	-	1
121	30,481	sesquiterpeno	>1700	-	1	-	1	-	-	-

1- Composto sugerido com maior similaridade entre os espectros de massa contidos no banco de dados da biblioteca NIST08;

2- IRL calculado para coluna com fase estacionário DB-1 com base no padrão de alcanos lineares;

3- Índices de retenção linear (DB-1) disponível no endereço online do Instituto Nacional de Padrões e Tecnológica (*National Institute of Standards and Technology*, biblioteca na versão NIST08) para o composto sugerido, disponível em "http://webbook.nist.gov/chemistry/";

4- Escala criada com base na média das três repetições: 0 = até $9,9 \times 10^2$ em abundância de corrente total de ions (TIC), 1 = $1 \times 10^3 - 100 \times 10^3$ (TIC), 2 = $100,1 \times 10^3 - 200 \times 10^3$ (TIC) e assim por diante;

5- Tempo de incubação dado em dias;

números em negrito também foram detectados no controle negativo do respectivo dia de incubação para o isolado em questão;

- não detectado/não encontrado

Os compostos contidos nas linhas de tom mais escuro possuem IRL calculado correspondente ao um intervalo de ± 5 unidades do IRL descrito na literatura

Fonte: o autor (2017)

Mais de 70 compostos, no total, foram detectados no *headspace* das culturas de A5 e D1. Uma característica marcante quanto aos voláteis produzidos por A5 é a grande variedade de cetonas produzidas, especialmente metil cetonas. Observa-se produção de metil cetonas pertencentes a uma série homóloga, tanto de cadeia linear, quanto metil *iso*-alquil e *anteiso*-alquil cetonas (Figura 26). Comportamento semelhante foi detectado na emissão de voláteis de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* 85-10 por Weise et al. (2012), que estudaram a produção de voláteis por esta linhagem de *X. campestris* cultivada em meio de cultura e produção de metil cetonas com comprimento de cadeia linear variando de C₆ a C₁₅, metil *iso*-alquil cetonas com cadeia principal com C₆ a C₁₅ e metil *anteiso*-alquil cetonas com cadeia principal contendo 7, 9, 11, 13 e 15 átomos de carbono.

No caso do isolado A5, apenas 2-hexanona e 14-metil-2-pentadecanona não foram detectadas como componente do *headspace* da cultura. Outros microrganismos também já foram relatados como produtores de uma série de metil cetonas, tais como diferentes linhagens de *Burkholderia ambifaria* (GROENHAGEN et al., 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 (YUAN et al. 2012) e *Pseudomonas* spp. (GIORGIO et al., 2015).

De modo geral, observa-se tendência de aumento na produção das cetonas de cadeia linear e da maioria de cadeia metil ramificada pelo isolado A5 do segundo para o sétimo dia de incubação seguida de diminuição do sétimo para o 14° dia. Além disso, alguns compostos foram detectados apenas em um dos dias de incubação, tais como os compostos 3, 16 e 90, no segundo dia; 35, no sétimo dia e os compostos 30 e 64, detectados apenas no 14° dia.

Outros compostos voláteis produzidos pelo isolado A5 foram detectados com concentração aproximadamente constante, tais como os compostos 32, 62, 66, 83, 89 e 116, dos quais apenas o 66 (2-(3-metilbutil)-3,5-dimetilpirazina) também foi encontrado entre os voláteis liberados pelo meio de cultura.

O isolado A5 apresentou a produção de muitos compostos exclusivos com relação aos outros isolados testados e ao meio de cultura. Estes foram os compostos 3, 8, 21, 30, 32, 35, 42, 52, 57, 60, 62, 64, 72, 73, 82, 83, 87, 90, 104, 111 e 121.

O isolado D1 também apresentou produção da maioria das metil cetonas produzidas por A5, além de outras. Entretanto, parte destas (14, 19, 20, 33, 110 e 115) foi detectada apenas com 14 dias de incubação. As cetonas encontradas entre os voláteis liberados apenas por D1 foram 5,5-dimetil-2,4-hexadienona, nerilacetona e 14-metil-2-pentadecanona, detectada aos 14 dias de incubação.

A biossíntese das metil cetonas de cadeia linear com número ímpar de átomos de carbono deve ocorrer a partir de descarboxilação do 3-oxoácido com mais um carbono formado por β -oxidação de ácidos graxos lineares de número par originados do *pool* de acetato, enquanto que as de número ímpar devem ser biossintetizadas a partir dos análogos de ácido com número ímpar formado. Os aminoácidos leucina e valina podem servir como iniciadores na biossíntese de compostos *iso*-alquil, enquanto que a *iso*-leucina serve como iniciador para a formação de compostos *anteiso*-ramificados (WEISE et al., 2012).

A hipótese da metabolização de leucina e *iso*-leucina para a síntese das metil cetonas ramificadas pelo isolado D1 é corroborada pela presença dos ácidos 3-metilbutanoico (7) e 2-metilbutanoico (9) no *headspace* da cultura deste isolado, pois estes são produtos formados pela desaminação oxidativa seguida de descarboxilação oxidativa daqueles respectivos aminoácidos (FILIPIAK et al., 2012).

Algumas das cetonas emitidas pelos isolados A5 e D1 possuem atividade biológica. 2-Nonanona e 2-heptanona inibem o crescimento da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e da cianobactéria *Synechococcus* sp., enquanto que a 2-undecanona impede o crescimento desta mesma cianobactéria e, em altas concentrações, dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Alternaria alternata* (KANCHISWAMY; MALVOY; MAFFEI, 2015). O fato de que 2-nonanona e 2-undecanona foram produzidas em altas concentrações pelo isolado A5 apontam

este como tendo potencial de inibição de crescimento dos microrganismos citados anteriormente.

Comparado ao isolado A5, o isolado D1 apresentou uma maior variedade de voláteis detectados apenas em um dos períodos de incubação. Os compostos 12, 27, 28, 31, 54, 92, 103 e 106 foram detectados apenas no segundo dia de incubação, os compostos 6, 13, 18 e 86 foram detectados apenas no sétimo dia de incubação e os compostos 14, 20, 22, 33, 84, 110, 115, 118, 119 foram detectados apenas no 14º dia. Além disso, foi observada tendência semelhante de produção dos compostos 61 (2-undecanona) e 91 (2-tridecanona) pelas duas bactérias testadas, ocorrendo aumento da concentração do segundo para o sétimo dia e queda na concentração do sétimo para o 14º dia. Neste caso, a diferença entre a produção dos dois compostos é a quantidade produzida, que é pelo menos 20 vezes maior para o isolado A5 do que para o isolado D1.

Álcoois e aldeídos não foram detectados no *headspace* das culturas de nenhuma das bactérias testadas. A não detecção dos compostos de cadeia curta com estes grupos funcionais pode ter ocorrido em razão de sua maior volatilidade, visto que o primeiro composto detectado (composto 1), ácido 2-metilpropanoico possui IRL igual a 752, enquanto que o álcool 2-metilpropílico (IRL = 611) e o 2-metilpropanal (IRL = 554) possuem valores de IRL significativamente menores, o que indica que eluiriam antes do primeiro composto detectado. Isso deve se aplicar a qualquer composto cujo IRL é menor que 752.

Ou seja, mesmo não tendo sido detectados alguns compostos típicos de fermentação, tais como etanol (IRL = 436), acetato de etila (IRL = 601) e ácido acético (IRL = 625), não significa que não foram produzidos. Existem evidências de que pelo menos ácido acético foi produzido, pois foram encontrados muitos ésteres de ácido acético, sendo os compostos 80 e 108 para o isolado A5 e 12 e 13 para o D1. Outra possibilidade para a não detecção de compostos mais voláteis associados à fermentação é a competição destes com relação à adsorção pela fibra de PDMS.

Alguns dos compostos encontrados no *headspace* dos isolados A5 e D1 já foram relatados como tendo atividade como atrativo para o *R. palmarum*. Sánchez et al. (1993) relataram que uma mistura de etanol, acetato de etila, pentano, hexanal, acetato de 3-metil-1-butila e/ou 3-metil-1-butanol agem como pista olfativa de curta distância para que o inseto encontre os locais de feridas frescas. Dentre os

compostos citados, o acetato de 3-metil-1-butila foi encontrado para o isolado D1 no segundo dia de incubação.

Rochat et al. (2000) elaboraram uma mistura de compostos sintéticos com base no compostos liberados pela fermentação de material vegetal oriundo da coroa do coqueiro capaz de atrair, em ação conjunta com o feromônio de agregação rincoforol, o *R. palmarum* com 50 a 80 % de eficácia comparado ao atraente natural (cana-de-açúcar em fermentação). Os compostos contidos na mistura sintética incluíam acetoína (componente maioritário), 2-hepanona, 2-nonanona, além de outros. Foi observada produção do um derivado de acetoína, o acetato de acetoína, pelo isolado D1. Além disso, ambos os isolados produziram 2-heptanona e 2-nonanona, sendo a primeira detectada apenas no 14° dia para o isolado D1 e nos 7° e 14° dias para o isolado A5 e a última detectada em todos os dias de fermentação para ambos os isolados, sendo em concentrações mais elevadas para o isolado A5.

Portanto, ambos os isolados produziram, em meio de cultura, voláteis que são reconhecidos como atrativos para o *R. palmarum*. Entretanto, estudos apontam que a produção de voláteis por parte de microrganismos é dependente do meio de cultura utilizado (GROENHAGEN et al., 2013; GARBEVA et al., 2014). Isto significa que o perfil de voláteis produzidos pelos isolados quando crescidos na casca do coco-verde pode variar significativamente. Exemplo disso já foi observado para o isolado A5, que apresenta odor característico do composto geosmina (“cheiro de terra”) quando crescido em meio mineral com celulose como única fonte de carbono, mas não quando crescido em meio rico em nutrientes (dados não apresentados).

Dois voláteis foram encontrados em comum entre os tentativamente identificados liberados pela casca do coco-verde e pelos isolados A5 e D1 em meio NYDAm, a 2-heptanona e a 2-octanona, sendo o primeiro conhecido como cairomônio para o *R. palmarum* (ROCHAT et al., 2000). O baixo número de voláteis encontrados em comum pode estar relacionado ao efeito da composição do meio na geração dos compostos ou ao fato de que a produção de voláteis na casca do coco-verde é dependente de uma comunidade microbiana, não de microrganismos individuais.

Os efeitos da presença de múltiplos de microrganismo na geração de voláteis e da composição do meio de cultura já foram descritos por Garbeva et al. (2014). No estudo em questão, não foi observada produção diferenciada de voláteis inibitórios ao fungo *Mucor hiemalis* pelas bactérias *Collimonas fungivorans* e *Collimonas*

pratensis quando cultivadas em meio rico em nutrientes na presença do fungo, mas um aumento da inibição foi detectado na presença do fungo quando as bactérias eram cultivadas em condições de limitação de nutrientes (areia estéril suplementada com meio pobre).

Os cromatogramas correspondentes aos voláteis produzidos pelas leveduras D5 e E4 podem ser observados nas Figuras 22 e 23, respectivamente e os compostos identificados nestas análises podem ser vistos na Tabela 12.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pelo isolado D5 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C. Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados numa concentração duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).

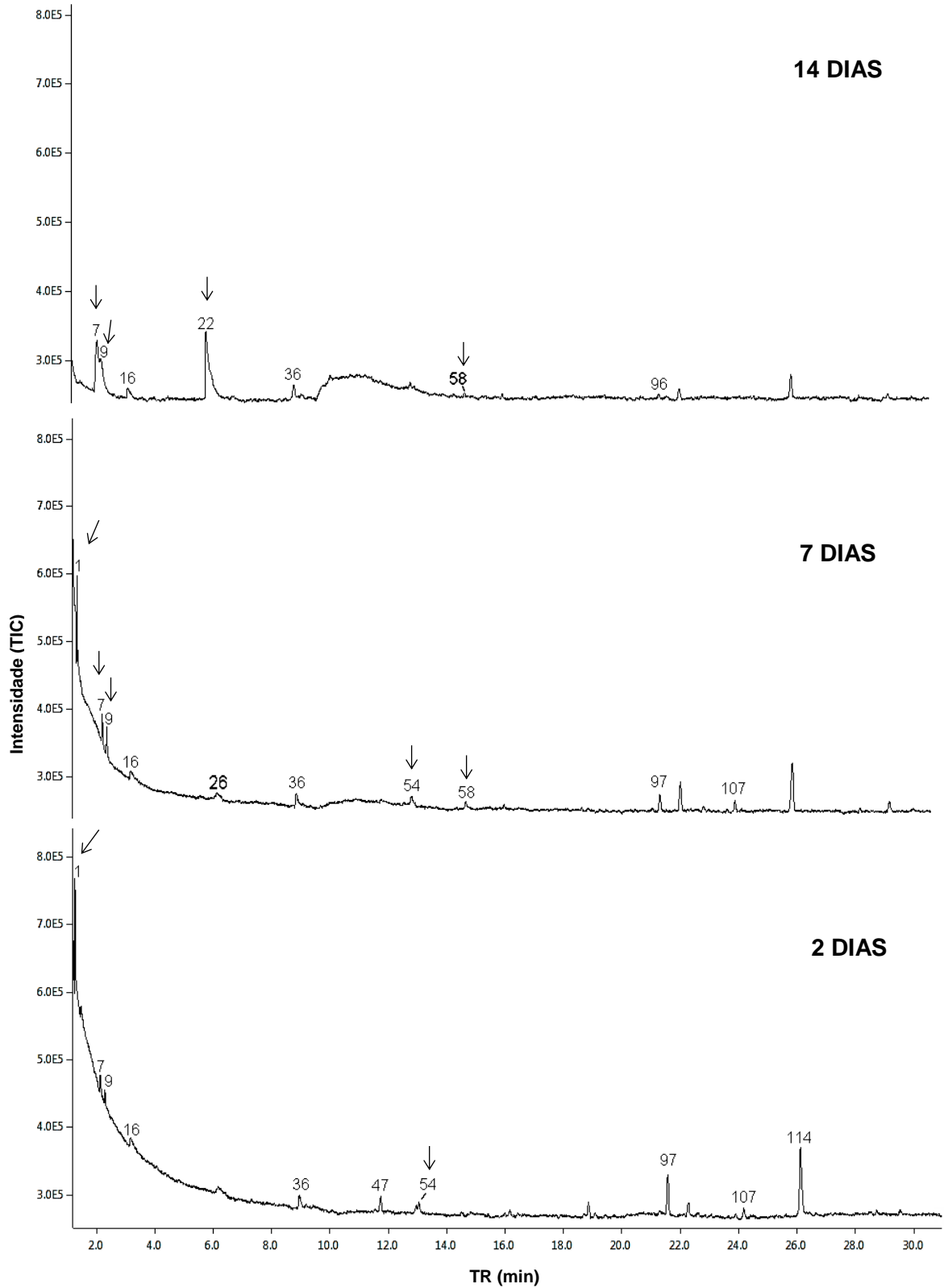
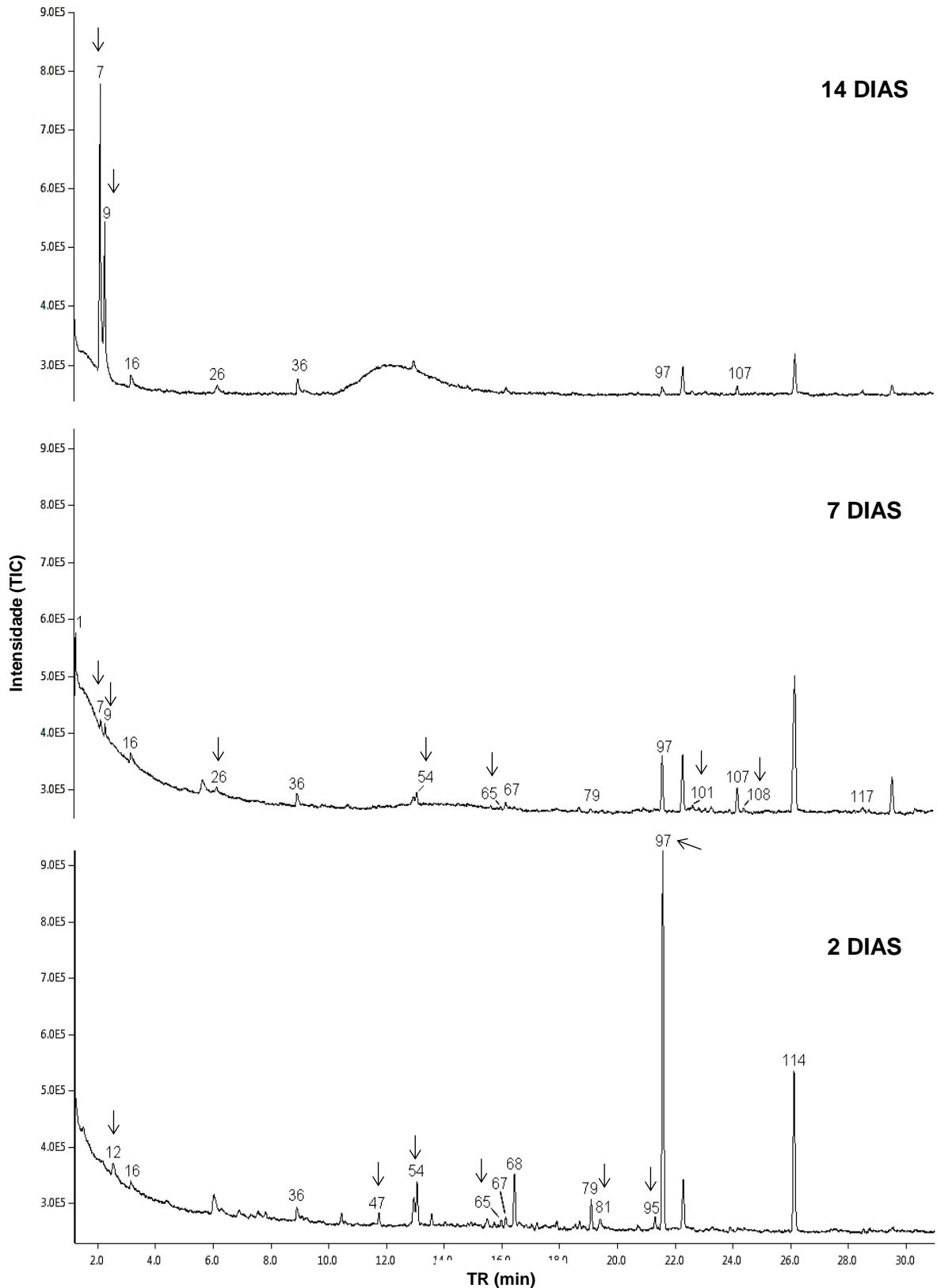


Figura 24 - Cromatogramas obtidos para as análises dos voláteis produzidos pela levedura E4 durante 2, 7 e 14 dias de incubação a 32°C. Os picos indicados com setas correspondem aos compostos não encontrados (ou encontrados numa concentração duas vezes menor) no controle negativo (meio NYDAm estéril).



Fonte: o autor (2017)

Tabela 12 - Compostos tentativamente identificados por CG-EM do *headspace* das culturas das leveduras D5 e E4 em 2, 7 e 14 dias de incubação a 32 °C.

pico	TR (min)	Composto ¹	IRL ²	IRL lit. ³	Quantidade do composto ⁴					
					D5			E4		
					2 ⁵	7	14	2	7	14
1	1,234	ácido 2-metilpropanoico	<1000	752	3[#]	2	-	1	2	-
4	1,594	ácido butanoico	<1000	797	1	-	-	-	-	-
7	2,026	ácido 3-metilbutanoico	<1000	826	1	3	2	1	1	12
9	2,228	ácido 2-metilbutanoico	<1000	839	1	2	2	1	1	8
12	2,546	acetato de 3-metil-1-butila	<1000	866	-	-	-	1	-	-
16	3,127	2,5-dimetilpirazina	<1000	885	1	1	1	1	1	1
22	5,856	2,4,6-trimetilpiridina	<1000	976	-	-	6	-	-	-
26	6,154	2,3,5-trimetilpirazina	<1000	988	-	1	1	-	1	1
36	8,899	3-etil-2,5-dimetilpirazina	1057	1059	1	1	1	1	2	2
43	11,527	3,5-dietil-2-metilpirazina	1135	1138	-	-	-	-	1	-
45	11,621	não identificado	1138	-	-	-	-	-	-	1
47	11,715	aromático não identificado	1141	-	1	-	-	2	1	1
48	11,998	aromático não identificado	1150	-	-	-	-	-	-	1
49	12,186	aromático não identificado	1156	-	-	-	-	-	-	1
50	12,405	aromático não identificado	1163	-	-	-	-	-	-	1
54	13,063	aromático não identificado	1184	-	1	1	-	3	1	-
58	14,830	4-etil-2-metoxifenol	1244	1247	-	1	1	-	-	-
65	15,980	4,6-dimetil-dodecano	1284	-	-	-	-	1	1	-
67	16,153	2,5-dimetil-3-(3-metilbutil)-pirazina	1290	1295	-	-	-	1	1	-
68	16,440	tridecano	1300	1300	-	-	-	3	-	-
79	19,095	tetradecano	1400	1400	-	-	-	2	1	-
81	19,393	γ-decalactona	1412	1414.6	-	-	-	1	-	-
95	21,302	ciclotetradecano	1489	-	-	-	-	1	-	-
97	21,575	pentadecano	1500	1500	2	1	1	22	4	1
101	22,626	5-(2-metilpropil)-nonano	1545	-	-	-	-	-	1	-
107	24,175	2,6-bis(1,1-dimeteil)-4-(1-metilpropil)-fenol	1612	-	1	1	-	1	2	1
108	24,396	não identificado	1622	-	-	-	-	-	1	-
114	26,120	heptadecano	1700	1700	4	-	-	8	-	-
117	28,514	ftalato de diisobutila	>1700	1819	-	-	-	0	1	-

1- Composto sugerido com maior similaridade entre os espectros de massa contidos no banco de dados da biblioteca NIST08;

2- IRL calculado para coluna com fase estacionário DB-1 com base no padrão de alcanos lineares;

3- Índices de retenção linear (coluna DB-1 ou fase estacionária equivalente) disponível no endereço online do Instituto Nacional de Padrões e Tecnológica (*National Institute of Standards and Technology*, biblioteca na versão NIST08) para o composto sugerido, disponível em "<http://webbook.nist.gov/chemistry/>";

4- Escala criada com base na média das três repetições: 0 = até $9,9 \times 10^2$ em abundância da corrente total de íons (TIC), 1 = 1×10^3 - 100×10^3 (TIC), 2 = $100,1 \times 10^3$ - 200×10^3 (TIC) e assim por diante;

5- Tempo de incubação dado em dias;

números em negrito também foram detectados no controle negativo (não necessariamente em concentrações similares) do respectivo dia de incubação para o isolado em questão;

- não detectado/não encontrado

Os compostos contidos nas linhas de tom mais escuro possuem IRL calculado correspondente ao um intervalo de ± 5 unidades de IRL descrito na literatura

Fonte: o autor (2017)

As leveduras E4 e D5 apresentaram menor produção de compostos voláteis, tanto em termos quantitativos quanto em termos qualitativos. As classes químicas encontradas nos voláteis produzidos por D5 foram ácidos carboxílicos lineares e ramificados, pirazinas, uma piridina, outros compostos aromáticos e hidrocarbonetos lineares, muitos dos quais também foram encontrados no *headspace* do controle negativo.

Apesar de D5 e E4 serem isolados teoricamente diferentes, foi observado comportamento similar para ambos nos cromatogramas para a região entre 10 e 14 minutos, especialmente no 14º dia de incubação. Não foram demarcados picos individuais nesta região, mas vale frisar que, de acordo com os espectros de massa da região (dados não mostrados), trata-se de uma região abundante em compostos aromáticos (presença dos íons de m/z 91 e 77), cuja identidade foi associada, pelo software de comparação de espectros de massas, ao álcool 2-feniletílico.

As classes químicas encontradas para os voláteis produzidos por E4 incluem ácidos carboxílicos ramificados, hidrocarbonetos ramificados, lineares e cíclicos, ésteres e compostos aromáticos tais como fenólicos e pirazinas, muitos dos quais também foram encontrados no controle negativo, embora não necessariamente na mesma concentração. Por exemplo, a produção de ácido 3-metilbutanoico é semelhante nos dias 2 e 7 de incubação para o controle e para o isolado E4, mas é mais que 11 vezes maior para o isolado E4 no 14º dia, indicando produção do ácido por atividade metabólica. Como a bactéria D1, o isolado E4 também produziu o acetato de 3-metilbutila no segundo dia de incubação, indicando contribuição deste isolado para a produção de voláteis atrativos ao *R. palmarum* L. (SÁNCHEZ et al., 1993).

Alguns compostos foram encontrados apenas nos voláteis produzidos pelas leveduras testadas. Os compostos 9, 12, 45, 47,49, 50, 65, 81, 95, 101 e 108 foram encontrados para o isolado E4. O composto 6,4-dimetildodecano (65) já foi identificado em extratos da cultura líquida do fungo *Trichoderma harzianum*, utilizado como agente de biocontrole contra microrganismos fitopatogênicos (SIDDIQUEE et al., 2012).

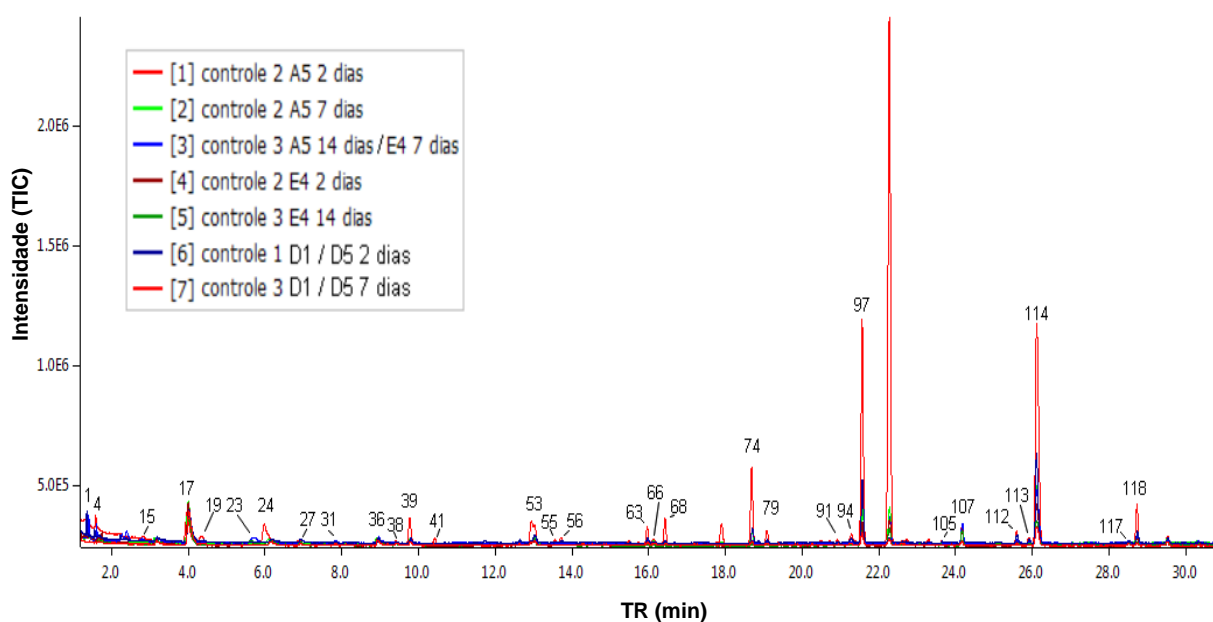
Os compostos produzidos por D5 e não encontrados no controle negativo são 9, 22, 54 e 58. O 4-etil-2-metóxifenol (58) já foi detectado como produto da atividade metabólica de algumas espécies de leveduras dos gêneros *Dekkera*, *Pichia* e *Candida*, sendo especialmente encontrado em vinhos fermentados com espécies de

tais gêneros (SUÁREZ et al., 2007). Já a 2,4,6-trimetilpiridina (22), a única piridina encontrada, foi documentada como sendo produto volátil das bactérias *C. fungivorans* e *C. pratensis*, sendo produzida apenas em areia com exsudatos de raiz com alta concentração de aminoácidos (GARBEVA et al., 2014).

Ao se compararem os voláteis liberados pelas leveduras com os liberados pelo processo de fermentação da casca do coco-verde, nota-se que não foram encontrados compostos em comum. Uma das possíveis explicações seria que as leveduras em questão (D5 e E4) não possuam grande atividade no processo de fermentação da casca do coco-verde. Entretanto, assim como para as bactérias, devem-se levar em conta outros fatores, tais como a diferença de substratos utilizados, ausência de outros microrganismos presentes no meio e a presença de oxigênio e seu efeito no metabolismo.

As análises dos voláteis do meio de cultura se mostraram de extrema importância para se determinarem quais voláteis foram produzidos pelas culturas. Além disso, muitos dos voláteis observados para o controle negativo não foram observados em nenhuma das culturas, tais como benzaldeído (17) e furfural (5). Uma comparação entre cromatogramas encontrados para os controles em diferentes dias pode ser observada na Figura 25.

Figura 25 - Compilação dos cromatogramas dos controles negativos (meio NYDAm estéril) obtidos para análises realizadas em momentos diferentes.



Fonte: o autor (2017)

O meio de cultura utilizado para a incubação dos isolados e estudo de produção de compostos voláteis foi meio NYDA_m, composto de extrato de levedura, extrato de carne e glucose, além de ágar como agente solidificante. Em razão de sua composição, o meio de cultura libera compostos voláteis que podem facilmente ser percebidos pelo olfato humano. Em razão disto, se faz necessário o estudo dos voláteis liberados pelo meio de controle estéril e incubado sob as mesmas condições que os testes com as bactérias e leveduras. Os voláteis detectados no *headspace* de frascos contendo apenas meio de cultura podem ser vistos na Tabela 13.

Tabela 13 - Compostos encontrados no controle para os respectivos dias de teste dos tratamentos com os isolados A5, D1, D5 e E4.

Pico	TR (min)	Composto ¹	IRL ²	IRL lit. ³	Quantidade do composto ⁴											
					A5			D1			D5			E4		
					2 ⁵	7	14	2	7	14	2	7	14	2	7	14
1	1,234	ácido 2-metilpropanoico	<1000	752	1	1	2	1	-	1	1	-	1	1	2	1
2	1,520	hexanal	<1000	778	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1,594	ácido butanoico	<1000	797	1	1	2	2	-	-	2	-	-	1	2	1
5	1,647	furfural	<1000	804	1	1	1	1	-	-	1	-	-	1	1	1
7	2,026	ácido 3-metilbutanoico	<1000	826	-	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
9	2,228	ácido 2-metilbutanoico	<1000	839	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
10	2,260	etilbenzeno	<1000	839,8	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
11	2,405	1,3-dimetilbenzeno	<1000	848,2	-	-	-	-	-	3	-	-	3	-	-	-
15	2,796	1,2-dimetilbenzeno	<1000	880	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	2	-
16	3,127	2,5-dimetilpirazina	<1000	885	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	4,007	benzaldeído	<1000	926	11	14	10	9	10	5	9	10	5	12	10	8
19	4,362	6-metil-2-heptanona	<1000	957	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	6,035	2-pentilfurano	<1000	980	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	6,094	2-etil-3-metilpirazina	<1000	982	1	1	1	1	-	-	1	-	-	1	1	1
25	6,105	não identificado	<1000	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
26	6,154	2,3,5-trimetilpirazina	<1000	988	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	-	1
27	6,906	fenilacetaldéido	1001	1002	1	1	1	1	1	-	1	1	-	1	1	1
31	7,796	acetofenona	1026	1025,2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1
34	8,266	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	1039	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
36	8,899	3-etil-2,5-dimetilpirazina	1057	1059	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2
37	9,077	benzoato de metila	1062	1063	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
38	9,398	2-nonanona	1071	1073	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	9,789	nonanal	1082	1082	4	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
40	10,184	5-metil-5-(1-metiletil)-3-heptino-2,6-diona	1093	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-

Tabela 13 – continuação...

41	10,430	undecano	1100	1100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	11,715	aromático não identificado	1141	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
51	12,625	2,5-dimetilbenzaldeído	1170	1137	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
53	13,032	decanal	1183	1183	5	2	1	3	2	-	3	2	-	1	1	1
55	13,565	dodecano	1200	1200	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	13,738	4,8-dimetil-1-nonanol	1206	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	14,859	não identificado	1245	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	15,951	undecanal	1283	1286	3	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
66	16,124	2-(3-metilbutil)-3,5-dimetilpirazina	1289	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	16,153	2,5-dimetil-3-(3-metilbutil)-pirazina	1290	1295	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	1
68	16,440	tridecano	1300	1300	3	1	1	1	-	-	1	-	-	-	1	1
69	16,652	valerato de mentila	1308	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	18,670	6,10-dimetil-2-undecanona	1384	-	8	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	18,697	dodecanal	1385	1385	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1
77	18,856	bifenileno	1391	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
78	19,013	trans- β -cariofileno	1397	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
79	19,095	n-tetradecano	1400	1400	2	1	1	1	1	-	1	1	-	1	1	1
80	19,368	não identificado	1411	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	19,913	2,5-ditertbutil-1,4-benzoquinona	1433	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
88	20,236	5-metil-2-phenil-2-hexenal	1446	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	20,459	não identificado	1455	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	20,905	2-tridecanona	1473	1473	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
93	21,277	tridecanal	1488	1488	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
94	21,302	tridecanal	1489	1488	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	21,426	5-metil-5-propilnonano	1494	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	21,575	pentadecano	1500	1500	28	7	5	8	4	2	8	4	2	4	5	3
100	22,626	heptadecano	1545	1700	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
102	23,069	2,4-dimetil-1-heptanol	1564	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
105	23,630	tetradecanal	1588	1586	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	23,910	hexadecano	1600	1600	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	24,175	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil)-fenol	1612	-	8	4	4	1	1	-	1	1	-	3	4	3
109	24,440	não identificado	1624	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
112	25,590	2-pentadecanona	1676	1675	2	1	13	2	1	1	2	1	1	1	13	1
113	25,899	pentadecanal	1690	1690	2	1	3	1	1	-	1	1	-	1	3	2
114	26,120	heptadecano	1700	1700	26	15	23	14	10	9	14	10	9	10	23	9

Tabela 13 – continuação...

117	28,514	ftalato de diisobutila	>1700	1819	1	1	3	-	-	-	-	-	-	1	3	1
118	28,724	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	>1700	1858	5	2	4	2	2	1	2	2	1	1	4	1
119	29,390	4-octadecilmorfolina	>1700	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
120	30,326	ftalato de dibutila	>1700	1910	1	1	1	1	-	-	1	-	-	1	1	1

1- Composto sugerido com maior similaridade entre os espectros de massa contidos no banco de dados da biblioteca NIST08 e/ou comparação com IRL da literatura;

2- IRL calculado para coluna com fase estacionário DB-1 com base no padrão de alcanos lineares;

3- Índices de retenção linear (coluna DB-1 ou fase estacionária equivalente) disponível no endereço online do Instituto Nacional de Padrões e Tecnológica (*National Institute of Standards and Technology*, biblioteca na versão NIST08) para o composto sugerido, disponível em "<http://webbook.nist.gov/chemistry/>";

4- Escala criada com base na média das três repetições: 0 = até $9,9 \times 10^2$ em abundância da corrente total de ions (TIC), 1 = 1×10^3 - 100×10^3 (TIC), 2 = $100,1 \times 10^3$ - 200×10^3 (TIC) e assim por diante;

5- Tempo de incubação dado em dias;

* IRL calculado corresponde ao IRL do composto autêntico descrito na literatura

- não detectado/não encontrado

Os compostos contidos nas linhas de tom mais escuro possuem IRL calculado correspondente ao um intervalo de ± 5 unidades de IRL descrito na literatura

Fonte: o autor (2017)

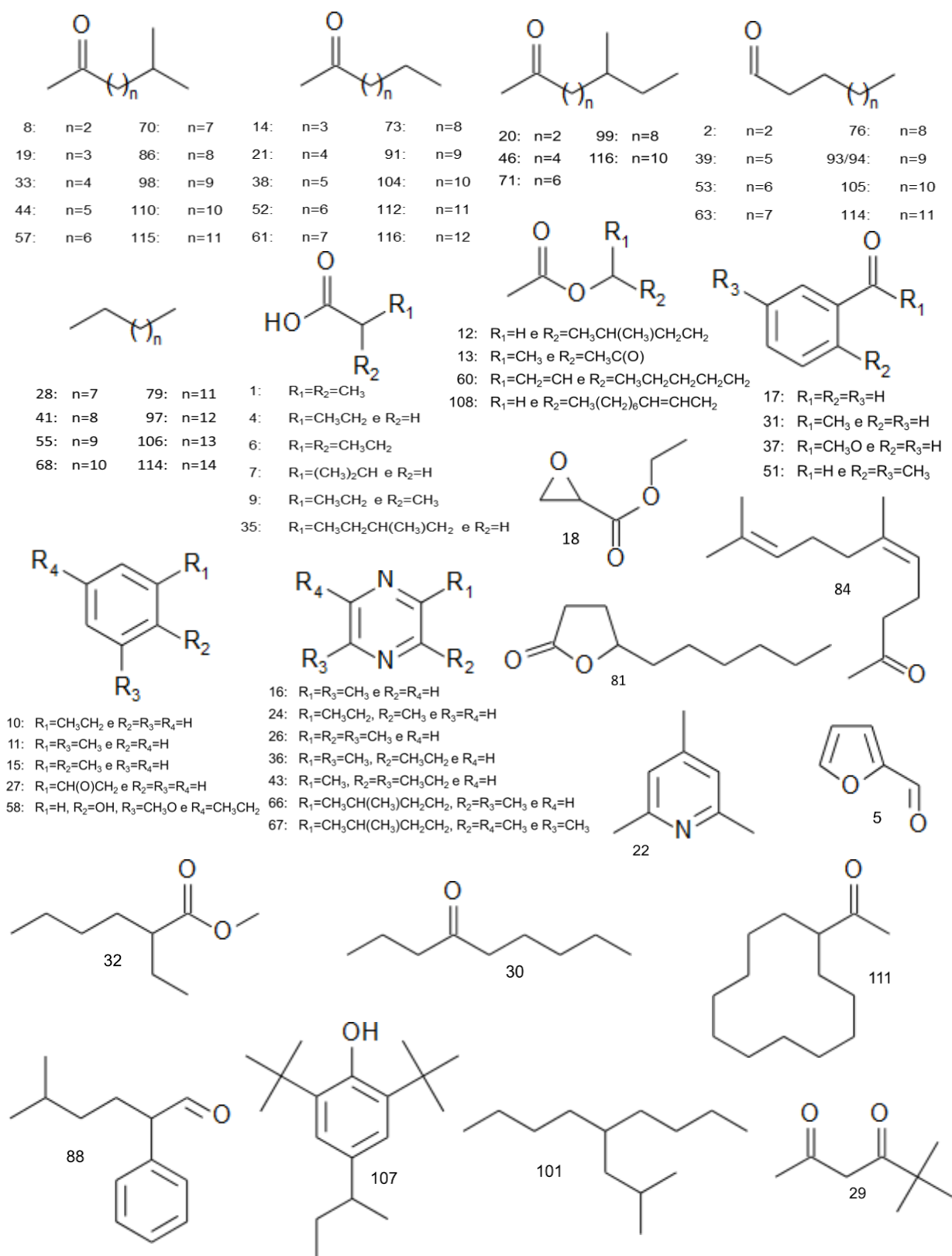
Compostos pertencentes às classes químicas dos aldeídos, aromáticos, hidrocarbonetos, cetonas, álcoois, pirazinas e ácidos carboxílicos, a exemplos do ácido 2-metilpropanoico (1), ácido butanoico (4), furfural (5), ácido 3-metilbutanoico (7), 2,5-dimetilpirazina (16), benzaldeído (17), 2-etil-3-metilpirazina (24), fenilacetaldéido (27), 3-etil-2,5-dimetilpirazina (36), nonanal (39), decanal (53), undecanal (63), 2,5-dimetil-3-(3-metilbutil)-pirazina (67), tridecano (68), tetradecano (79), pentadecano (97), 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil)-fenol (107), 2-pentadecanona (112), pentadecanal (113), heptadecano (114), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (118) e ftalato de dibutila (120). Além disso, foram encontrados alguns terpenos e derivados, tais como o valerato de mentila (69) e o β -cariofileno (78). As estruturas de alguns destes compostos podem ser observadas na Figura 26.

Muitos dos compostos detectados já foram encontrados como constituintes da fração volátil de pastas de extratos de levedura num estudo realizado por Lin et al. (2013). No estudo em questão, estes autores encontraram mais de 40 compostos originados de extrato de levedura, incluindo hexanal, benzaldeído, ácido 2-metilpropanoico, ácido 3-metilbutanoico, furfural, 2,6-dimetilpirazina, trimetilpirazina, entre outros.

Portanto, evidências na literatura sugerem que a fonte de alguns dos compostos voláteis detectados no *headspace* de amostras com apenas o meio de cultura tiveram sua origem no extrato de levedura. Além disso, é possível que parte dos compostos ou de seus precursores também tenha se originado do extrato de carne, visto que se trata de um material com composição orgânica complexa.

Outra possível fonte de formação dos compostos detectados é o processo de autoclavagem, que consiste no aquecimento do meio a 121°C sob pressão durante 20 minutos, condições que podem favorecer reações entre os diversos componentes do meio, tais como a decomposição térmica da glicose, de aminoácidos e diversas reações entre seus produtos.

Figura 26 - Estruturas de alguns compostos tentativamente identificados no *headspace* de culturas das bactérias A5 e D1, das leveduras D5 e E4 e do controle negativo (meio NYDAm estéril).



6 CONCLUSÃO

Os isolados obtidos da casca do coco-verde em fermentação apresentaram capacidade de produção de celulasas, xilanasas e polifenoloxidasas, enzimas envolvidas na degradação da casca do coco-verde. Os isolados A5, D1 e E4 produziram compostos voláteis descritos como atrativos para *R. palmarum*, comprovando relação entre a atividade metabólica dos microrganismos presentes na casca coco-verde em fermentação e produção de compostos atrativos a esta praga do coqueiro. Além disso, tanto as bactérias quanto as leveduras isoladas apresentaram potencial biotecnológico variável, sendo a bactéria A5 a mais promissora por apresentar atividade enzimática de nove enzimas extracelulares de interesse industrial.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A identificação por MALDI-TOF deve ser novamente realizada com procedimento indicado para melhor resultado dos espectros. Além disso, os isolados devem ser identificados por técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciamento dos genes 16S DNA para bactérias e ITS do DNA nuclear (nrDNA) para leveduras). Também há a possibilidade de aprofundamento na investigação de aplicações biotecnológicas dos microrganismos isolados, bem como na ecologia química dos voláteis produzidos e seus efeitos sobre outros organismos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, A.; SHEARER, C. A. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. **Fungal diversity**, v. 11, p1-19, 2002.
- ABE, C. A. L. et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 15328-15346, 2015.
- ADETUNJI, L. R. et al. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 239-250, 2017.
- AGARWAL, P. et al. L-Tyrosinase—a multifunctional enzyme: structural and molecular features. **Gene and Protein Engineering**, 5th ed. Studium Press, LLC, Houston, p. 427-444, 2014.
- AHMAD, R. et al. Alpha amylase assisted synthesis of TiO₂ nanoparticles: structural characterization and application as antibacterial agents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, 2015.
- AKHTAR, M. K.; TURNER, N. J.; JONES, P. R. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 87-92, 2013.
- ALNAHDI, H. S. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 071-074, 2012.
- ALVES-PRADO, H. F. et al. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010. DOI 10.1007/s12010-009-8823-5.
- ANTONY, R et al. Diversity and physiology of culturable bacteria associated with a coastal Antarctic ice core. **Microbiological research**, v. 167, n. 6, p. 372-380, 2012.
- ANDRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117-139, 2014. doi:10.3390/biom4010117.
- ARGUELLO, J. R. et al. Can Yeast (*S. cerevisiae*) Metabolic Volatiles Provide Polymorphic Signaling? **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70219, 2013.

AUDRAIN, B. et al. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 222-233, 2015.

AZAD, K; HOSSAIN, F.; HALIM, M. A. Screening of cellulase, pectinase and xylanase activities and optimization of radial mycelial growth of two thermophilic fungi. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 207-213, 2013.

AZUARA-DOMÍNGUEZ, A. et al. Trapping *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: curculionidae) with fermented Tequila Agave, and Identification of the Attractant Volatiles. **Southwestern entomologist**, v. 37, n.3, p. 340-349, 2012.

BAVENDAMM, W. Originalabhandlungen. Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei Holzzerstörenden Pilzen. **Z Pflanzen Pflanzenschutz**, v. 38, p. 257–276, 1928.

BERRADA, I. et al. Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2419-2434, 2012.

BLEVE, G. et al. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 982–989, 2011.

BLOM, D, et al. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. **Environmental Microbiology**, v.13, p. 3047–3058, 2011. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x

BORA, L.; GOHAIN, D.; DAS, R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 1959-1970, 2013.

BUDIHAL, S. R.; AGSAR, D.; PATIL, S. R. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 706-712, 2016.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para a determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa, 1999.

CAVALCANTE, L. V. A nova geografia da produção de coco no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DA ANPEGE, 11, 2015, Presidente Prudente. **Anais...**, 2015.

CAZIN JR., J. et al. Extracellular deoxyribonuclease Production by yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.100, n. 2, p. 760-762, 1969.

CESKA, M. Enzymatic Catalysis in Solidified Media. **European Journal of Biochemistry** v. 22, p.186-192, 1971.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 17, n. 2, p. 326–342, 2015.

CHAUD, L. C. S. et al. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **New Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 807–814, 2016.

CHAUDHRI, A.; SUNEETHA, V. Microbially Derived Pectinases: A Review. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.2, n.2, p.01-05, 2012.

CHEN, Y. et al. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6994-6999, 2010.

CHI, Z. et al. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 534–538, 2007.

CHRISTOPHER, K. AND E. BRUNO. Identification of bacterial species. In: O'DONNELL, M. A. (Ed.). **Tested studies for laboratory teaching**, Proceedings of the 24th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 2003. v.24, p. 103-130.

CIRIMINNA, R. et al. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.9, n.4, p. 368-377, 2015.

COLLARES, R. M. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. **Journal of Zhejiang University Science B - Biomedicine & Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 579-586, 2012.

COMBET, E. et al. Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. **Mycoscience**, v. 47, n. 6, p. 317-326, 2006.

CORRADINI, E. et al. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 837-846, 2009.

COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. São Paulo: Artmed, 2011.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.4, p. 1114-1118, 1990.

CUENCA, M. A. G. Importância econômica da cocoicultura no Brasil. **Embrapa Tabuleiros Costeiros – Sistema de produção**. 2ª edição. 2016. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_lifecycle=0&p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_col_count=1&p_p_col_id=column-2&p_p_state=normal&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7703&p_r_p_-996514994_topicold=7829&p_p_mode=view>, acesso em 21 de junho de 2017

DALFARD, A. B. et al. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.1409-1416, 2006.

DENNIS, C. Breakdown of cellulose by yeast species. **Journal of General Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 409-411, 1972.

DESHMUKH, S. S.; SHANKAR, V. Extracellular nucleases from a thermophile, *Streptomyces thermonitrificas*: purification and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n.2, p.273-278, 2004.

DE SOUZA, A. C. et al. Sugarcane bagasse hydrolysis using yeast cellulolytic enzymes. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1403-1412, 2013.

DEVI, M. C.; KUMAR, M. S. Isolation and screening of lignocellulose hydrolytic saprophytic fungi from dairy manure soil. **Annals of Biological Research**, v.3, n. 2, p. 1145-1152, 2012.

DEY, S.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYYA, B. C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4216-4218, 1994.

DUARTE, A. G. **Infoquímicos no Controle de *Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus***: Formulação de Feromônio e Monitoramento e Manejo do Subproduto Casca do Coco Verde. 2015. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2015.

EISENMAN, H. C. et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954–3962, 2007.

FACCIO, G. et al. Bacterial tyrosinases and their applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1749–1760, 2012.

FERREIRA, J. M. S. et al. **Manejo integrado da broca-do-olho-do-coqueiro *R. palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae)**. Aracajú: EMBRAPA, 2014. 8 p. (EMBRAPA, Comunicado técnico, 141).

FILIPIAK, W. et al. Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 113, 2012.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by trichoderma strains. **Enzyme Research**, v. 2012, p.1-7, 2012.

FONTAINE, M. C.; PEREZ-CASAL, J.; WILLSON, P. J. Investigation of a Novel DNase of *Streptococcus suis* Serotype 2. **Infection and Immunity**, v. 72, n.2, p. 774-781, 2004.

FONTENELE, R. E. S. Cultura do coco no Brasil: caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. In: CONGRASSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 43, 2005, Ribeirão Preto. **Anais...**, 2005.

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: A review. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 3733-3754, 2014.

GARBEVA, P. et al. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.87, p. 639–649, 2014.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 47, p.1-13, 2016.

GEBREYOHANNES, G. Isolation and optimization of amylase producing bacteria and actinomycetes from soil samples of Maraki and Tewedros campus, University of Gondar, North West Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 31, p. 1877-1882, 2015.

GHASEMI, Y. et al. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo salt lake. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 175-180, 2011.

GIORGIO, A. et al. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 2015.

GOLDBECK, R. et al. Screening and identification os cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 53, p.11595-11603, 2012

GOSWAMI, Girish K.; PATHAK, Rakesh R. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 237-246, 2013.

GONÇALVES, G. A. L. et al. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 16–24, 2015.

GONÇALVES, F. A. et al. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1–12 , 2015.

GOTTLIEB, S.; PELACZAR JR., M. J. Microbiological aspects of lignin degradation. **Bacteriological Reviews**, v. 15, n. 2, p. 55-76, 1951.

GRICAJEVA, A.; BENDIKIENÈ, V.; KALÈDIENÈ, L. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 96–104, 2016.

GROENHAGEN, U. et al. Production of Bioactive Volatiles by Different *Burkholderia ambifaria* Strains. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 892–906, 2013.

GUAN, Z. B. et al. Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 1–6, 2014.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n.11, p.1599-1616, 2003.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

GUPTA, A. et al. Omega-3 fatty acid production from enzyme saccharified hemp hydrolysate using a novel marine thraustochytrid strain. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 373-378, 2015.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v.57, p. 40-54, 2015.

HABE, E. et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 40-44, 2000.

HABIBNIA, S. et al. Phenotypic characterization of *Nocardia* spp. isolated from Iran soil microflora. **International Journal of Environmental Health Engineering**, v. 4, n. 1, p. 20, 2015.

HALLET, R. H. Aggregation pheromone of coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: scarabaeidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n.10, p.1549-1570, 1995.

HAN, Y. W.; SRINIVASAN, V. R. Isolation and Characterization of a Cellulose-utilizing Bacterium. **Applied Microbiology**, v.16, n.8, p.1140-1145, 1968.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; ABDUL, H. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HATEFI, A. et al. Characterization of a bi-functional cellulase produced by a gut bacterial resident of Rosaceae branch borer beetle, *Osphranteria coerulescens* (Coleoptera: Cerambycidae). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 158-164, 2017.

HEDDERGOTT, C.; CALVO, A. M.; LATGÉ, J. P. The volatome of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 1014-1025, 2014.

HEREDIA-SANDOVAL, N. G. et al. Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality. **Foods**, v.5, n. 59, 2016.

HICKEY, M. E. et al. Identification of Extracellular DNase-producing Bacterial Populations on Catfish Fillets during Refrigerated Storage. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 87-92, 2013.

HO, H. L.; LYLIA, Z. Optimized Production of Xylanase by *Aspergillus brasiliensis* under Submerged Fermentation (SmF) and its Purification Using a Two-step Column Chromatography. **Journal of Advances in Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 1-22, 2015.

HOLIGHAUS, G. et al. Ubiquitous eight-carbon volatiles of fungi are infochemicals for a specialist fungivore. **Chemoecology**, v. 24, p. 57–66, 2014. doi: 10.1007/s00049-014-0151-8.

HU, J. High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 251-257, 2015.

HYNES, W. L.; TAGG, J. R. A simple plate assay for detection of group A streptococcus proteinase. **Journal of Microbiological Methods**, v.4, p. 25–31, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE – Produção agrícola municipal, 2015. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>, acesso em: 26 de junho de 2017.

IKEHATA, K.; NICELL, J. A. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 533-540, 2000.

ISRAEL, A. U. et al. Extraction and characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) coir dust. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 33, n. 6, p. 717-724, 2011.

JABALIA, N.; MISHRA, P. C.; CHAUDHARY, N. Application, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. **Journal of Agroecology and Natural resource Management**, v.1, n. 3, p.179-183, 2014.

JADHAV, J. P. et al. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 394–400, 2007.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAIDEV, CH. L. R.; NARASIMHA, G.; SAIGOPAL, D. V. R. Decolorization of rose bengal dye by *Aspergillus niger* isolated from soil contaminated with dye effluents. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 12, n. 2, p. 1-5, 2010.

JAOUANI, A. et al. Diversity and enzymatic profiling of Halotolerant Micromycetes from Sebkhia El Melah, a sahatian salt in souther Tunisia. **BioMed Research International**, v. 2014. 2014.

JEFFRIES, I. D. F.; GUSE, D. G. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. **Journal of Bacteriology**, v. 73, p.590-591, 1957.

JISHA, V. N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1219-1227, 2012.

KÄÄRIK, A. The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. **Studia Forestalia Suecia**. Nr. 31, 1965.

KAISER, B. K. et al. Fatty aldehydes in cyanobacteria are a metabolically flexible precursor for a diversity of biofuel products. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.

KALYANI, D. et al. A highly efficient recombinant laccase from the yeast *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

KAMBLE, K. D.; KAMBLE, L. H.; MUSADDIQ, M. Optimization of pH and temperature for deoxyribonuclease producing bacteria obtained from soil. **Bioscience Discovery**, v. 2, n.3, p. 378-385, 2011.

KANCHISWAMY, C. N.; MALVOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 151, 2015.

KANDASAMY, K. et al. Yeasts in marine and estuarine environments. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 3, n. 6, p. 74-82, 2012.

KAR, S.; RAY, R. C. Purification, characterization and application of thermostable exo-polygalacturonase from *Streptomyces erumpens* mtcc 7317. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 133–147, 2011.

KARMAKAR, M; RAY, R. R. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41-53, 2011.

KARIM, K. M. R. et al. Heterologous, Expression, and Characterization of Thermostable Glucoamylase Derived from *Aspergillus flavus* NSH9 in *Pichia pastoris*. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016. 10 p.

KATOCH, M. et al. Endophytic fungi found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes and Antimicrobial Bioactive Compounds. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 57, n.5, p. 714-722, 2014.

KHAN, F. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovative Research in Chemistry**, v. 1, n.1, p. 1-6, 2013.

KHAN, S.; MATHUR, N. Biodegradation of Different Dye by Bacterial Strains Isolated from Textile Effluents of Western Rajasthan, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 994-1001, 2015.

KISHIMOTO, K. et al. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, p. 35–37, 2007. doi: 10.1007/s10327-006-0314-8.

KOTOGÁN, A. et al. Screening for Extracellular Lipase Enzymes with Transesterification Capacity in *Mucoromycotina* Strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n.1, p. 73–82, 2014.

KRANTHI, S. U.; APARNA, Y.; SARADA, J. Biofilm dispersal activity of DNase produced by *Serratia* sps YAJS. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 839-849, 2014.

KULKARNI, P.; GUPTA, N. Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production. **Recent Research in Science and Technology**, v. 5, n. 2, 2013.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUMAR, S. A. et al. Screening of extracellular hydrolytic enzymes from *Marynobacter Hydrocarbonoclasticus* strain AK5. **The Bioscan**, v.5, n.1, p. 97-99, 2010.

KUMAR, S. et al. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1595-1603, 2012.

KUMAR, D. et al. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. Strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1763-1770, 2012.

KUMAR, S. et al. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

KUNAMNENI, A. et al. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 32, 2008.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n.4, p.330-338, 2012.

LEATHERS, T. D.; GUPTA, S. C. Saccharification of corn fiber using enzymes from *Aureobasidium* sp. strain NRRL Y-2311-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 3, p. 337-347, 1996.

LEE, H. et al. Utilization of Xylan by Yeasts and Its Conversion to Ethanol by *Pichia stipitis* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 320-324, 1986.

LEE, J.; OH, E. Screening of white rot fungi with selective delignification capacity for biopulping. **The Korean Journal of Mycology**, v. 26, n. 2, p. 144-152, 1998.

LEISOLA, M.; PASTINEN, O.; AXE, D. D. Lignin—Designed Randomness. **BIO-Complexity**, v. 2012, n. 3, p. 1–11, 2012.

LEMFAK M. C. et al. mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Research**, v.42, n. D1, p. D744-748, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1250.

LEROY, P. D. et al. The semiochemically mediated interaction between bacteria and insects. **Chemoecology**, v. 21, n. 113, 2011. DOI 10.1007/s00049-011-0074-6.

LIANG, Y. et al. Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LIMA, E. B. C. et al. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto , v. 48, n. 11, p. 953-964, 2015.

LIN, M. et al. Aroma-active components of yeast extract pastes with a basic and characteristic meaty flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 882–889, 2014.

LIU, Z. Q. et al. Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 452–460, 2012.

LONG, K. et al. Screening, isolation and identification of microbial lipase producers from palm oil mills. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 32, n. 1, p. 67-74, 2004.

LÓPEZ-LÓPEZ, O.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, p. 445-455, 2014.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p. 506-577, 2002.

MA, Q.; YANG, R. Alkaline Xylanase Produced by *Trichoderma reesei*: Application in Waste Paper Pulp Bleaching. **BioResources**, v. 10, n. 4, p. 8084-8057, 2015.

MAAREL, M. J. E. C.; LEEMHUIS, H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n.1, p. 116–121, 2013.

MACIEL, M. J. M.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, H C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n. 6, 2010.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p.1694-1717, 2009.

MADINGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 13th Ed. San Francisco: Pearson Education, Inc., 2011.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v.1, p.44–49, 2015.

MANDELS, M.; RESSE, T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of bacteriology**, v. 37, n. 2, pp. 269 – 278, 1957.

MANITCHOTPISIT, P. et al. α -Amylase activity during pullulan production and α -amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1211–1218, 2011.

MARGOT, J. et al. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 3, n. 63, p. 1-14, 2013.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, v. 69, p. 215-32, 1950.

MATTOS, A, L. A. et al. **Beneficiamento da casca de coco verde**. EMBRAPA, 2013. Disponível em:
<http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3830.pdf>, acesso em 19 de outubro de 2016.

MATYSIK, S.; HERBARTH, O.; MUELLER, A. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOC) by passive sampling onto charcoal sorbents. **Chemosphere**, v.76, p. 114-119, 2009.

MECHRI, S. et al. Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 383–397, 2017.

MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 163-182, 2015.

METRIS, A. et al. Metabolic shift of *Escherichia coli* under salt stress in the presence of glycine betaine. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 15, p. 4745-4756, 2014.

MINOTTO, E. et al. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, p. 16-23, 2014.

MISHRA, A; SARDAR, M. Alpha-amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. **Science of Advanced Materials**, v.4, n.1, 2012.

MISHRA, A; SARDAR, M. Alpha amylase mediated synthesis of gold nanoparticles and their application in the reduction of nitroaromatic pollutants. **Energy and Environment Focus**, v.3, n.1, 2014.

MOJSOV, K. Microbial α -amylases and their industrial applications: a review **International Journal of Management, IT and Engineering**, v. 2, n. 10, p. 583-609, 2012.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; SREE, A. Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. **Biotechnologia Acta**, v. 23, n. 1, p. 75–84, 2003.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73-83, 2012.

MOURA, J. I. L. et al. Captura de *R. palmarum* (L.) pelo Uso de Feromônio de Agregação Associado a Árvore-Armadilha e Inseticida. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p.69-73, 1997.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, p. 1-34, 2012.

NAIDU, M. A.; SARANRAJ, P. Bacterial Amylase: A Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 4, n. 2, p. 274 – 287, 2013.

NAIDU, Y. et al. *In vitro* screening of biocontrol and biodegradation potential of selected hymenomycetes against *Ganoderma boninense* and infected oil palm waste. **Forest Pathology**, v. 45, n. 6, p. 474-483, 2015.

NERY, R. B. R. et al. Use of Green Coconut Shells as an Alternative Substrate for the Production of Xanthan Gum on Different Scales of Fermentation. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 602-607, 2013.

NEVILLE, S. A. et al. The Utility of Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) following introduction for routine laboratory bacterial identification. **Journal of clinical microbiology**, v.49, n. 8, p. 2980-2984, 2011.

NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013. doi:10.3390/biom3030597

ONDERCI, M. et al. Efficacy of supplementation of α -amylase-producing bacterial culture on the performance, nutrient use and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. **Poultry Science**, v. 85, 2006.

OLIVEIRA, A. P. A. et al. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 14, p. 1215-1223, 2015.

ONG, SA. et al. Biodegradation of redox dye Methylene Blue by up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 124, n.1, p. 88–94, 2005.

OREN, A. Life at high salt concentrations. In: DWORKIN, M. et al. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. Singapore: Springer, 2006. v.2, p. 263-282.

OTERO, D. M. et al. Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1961-1969, 2015. DOI: 10.5897/AJB2015.14476.

PAJOT, H. F.; FARIÑA, J. I.; DE FIGUEROA, L. I. C. Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1199–1207, 2011.

PAUL, D. Microorganisms and α -Amylase: A Concise Review. **Innovare Journal of Science**, v. 4, n. 4, p.1-5, 2016.

PAULY, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, p. 627-642, 2013.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

PETROSK, R. J.; TELLE, M. R.; BEH, R. W. In: **Semiochemicals in Pest and Weed Control**. Washington, Dc: American Chemical Society, 2005.

PINO, G. H. et al. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder. **Minerals engineering**, v. 19, n. 5, p. 380-387, 2006.

PRESTON, N. W.; MORRELL, A. Reproducible results with the Gram stain. **The Journal of Pathology**, v. 84, n. 1, p. 241-243, 1962.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 916-921, 2001.

PUREWAL, S. S. Biodegradation efficiency of *Aspergillus awamori* (MTCC-548) against Rose Bengal: A toxic dye for human corneal epithelium. **KAVAKA**, v. 43, n. 32-34, 2014.

QUAX, W. J. Bacterial Enzymes. In: **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**, v.1, p. 777-796, 2006.

RAJAN, A. et al. Isolation of novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPLC. **International Journal of Biochemistry**, v.5, n. 2, p.116-126, 2011.

RAJU, E. V. N.; DIVAKAR, G. Screening and Isolation of Pectinase producing Bacteria from Various Regions in Bangalore. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, n.1, 151-154, 2013.

RAMIN, M. et al. Filter Paper Degradation by Bacteria Isolated from Local Termite Gut. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 565-568, 2008.

RAO, S. et al. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 441–446, 2011.

RAVAL, K. M.; VASWANI, P. S.; MAJUMDER, D. R. Biotransformation of a single amino acid L tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. **International Journal of Scientific Research**, v. 2, p. 2250–3153, 2012.

RAJCHARD, J. Kairomones – important substances in intraspecific communication in vertebrates: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 11, p. 561-566, 2013.

RAJESH, B. et al. Screening and microbial characterization of lipase producing organic solvent tolerant *Lysinibacillus Fusiformis* C5 (MTCC 11801). **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 4, n. 11, 2013.

REEDY, P. L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. **International**

Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research, v.1, n.3, p. 186-193, 2012.

REZENDE, E. F. et al. Enzymatic and toxicogenic potential of fungi isolated from coffee beans. **Coffee Science**, Lavras, v.8, n. 1, p. 63-70, 2013.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, p. 67-82, 2013.

ROCHAT, D. et al. Identification of pheromone synergists in American Palm weevil, *R. palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 155-187, 2000.

RODARTE, M. P. et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

ROMÁN-PONCE, B. et al. Cultivable endophytic bacteria from heavy metal(loid)-tolerant plants. **Archives of Microbiology**. 2016. doi:10.1007/s00203-016-1252-2.

ROSA, M. F. et al. **Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde**. Fortaleza: EMBRAPA, 2001. 4 p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 61)

ROY, P.; NAYAK, K. K.; PANDEY, N. K. Characterization of a Novel Yeast Synthesizing Melanin-like Pigment. **Journal of general microbiology**, v. 135, n. 1989, p. 3385–3391, 1989.

ROY, S. et al. Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. **Frontiers in Biology**, v. 9, n. 4, p. 306–316, 2014.

SAHNI, T. K.; GOEAL, A. microbial enzymes with special reference to α -amylase. **BioEvolution**, v. 2, n.1, p. 19-25, 2015.

SANCHEZ, P. et al. Chemical ecology of the palm weevil *R. palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 1703-1720, 1993.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass spectrometry reviews**, v. 32, n. 3, p. 188-217, 2013.

SAPARRAT, M. C. N. et al. Liginolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. **Process Biochemistry**, v. 43, 2008.

SCHEIDLER, N. H. et al. Volatile codes: Correlation of olfactory signals and reception in *Drosophila*-yeast chemical communication. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14059, 2015.

SCHLEGEL, H. G.; JANNASCH, H. W. Prokaryotes and Their Habitats. In: **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**, v.1, p. 137-184, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Atividade celulolítica *in vitro* de *Cylindrocladium clavatum* e o efeito de filtrados de cultivo do fitopatógeno sobre plântulas de eucalipto. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 25, n. 1, p. 155-160, 2003.

SCHWARZ, W. H. the cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 634-649, 2001.

SENG, P. et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, v.51, n.7, p. 2182-2194, 2013.

SETATI, M. E. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1555-1560, 2010.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n. 6, p. 823–832, 2007.
doi:10.1007/s11274-006-9305-3

SHUKLA, A. N. **Industrial Enzymology**. New Delhi: Discovery Publishing Pvt., 2009.

SHUSTER, V.; FISHMAN, A. Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 188–200, 2009.

SIDDIQUEE, S. et al. Separation and Identification of Volatile Compounds from Liquid Cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using Three Different Capillary Columns. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 358–367, 2012.

SILVA, C. M. et al. Distribuição espacial do anel vermelho (*Bursaphelenchus cocophilus*) e da resinose (*Thielaviopsis paradoxa*) em coqueiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 3, 2016.

SILVA, M. C. S. et al. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 16-22, 2016.

SIVAKUMAR, R. et al. Isolation, Screening and Optimization of Production Medium for Thermostable Laccase Production from *Ganoderma* sp. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n.12, p. 7133-7141, 2010.

SMITH, J. E. **Biotechnology**. 5th Ed. New York: Cambridge University Press, 2009.

SOARES, I. et al. Microorganism-Produced Enzymes in the Food Industry. In: **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**, Dr. Benjamin Valdez (Ed.). InTech, 2012.

SOLANO, F. et al. Isolation and Characterization of Strain MMB-1 (CECT 4803), a Novel Melanogenic Marine Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p.3499-3506, 1997.

SOLIMAN, E. P. et al. Avaliação da atratividade de diferentes iscas ao *R. palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) no cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Nucleus**, v. 7, n.1, p. 197-202, 2010.

SOUSA, F. W. et al. Green coconut shells applied as adsorbent for removal of toxic metal ions using fixed-bed column technology. **Journal of environmental management**, v. 91, n. 8, p. 1634-1640, 2010.

SOUZA, P. M. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p337-346, 2015.

SPECIAN, V. et al. Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.

SPLIVALLO, R. et al. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 175, p. 417–424, 2007. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02141.x

SRIDEVI, B.; CHARYA, M. A. S. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 22, p. 4624-4630, 2011.

SUÁREZ, R. et al. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. **Food Chemistry**, v. 102, p.10–21, 2007.

SUBRAMANIAN, J.; RAMESH, T.; KALAISELVAM, M. Fungal Laccases – Properties and Applications : A Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 5, n. 2, p. 8–16, 2014.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 65, p. 832-844, 2005.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

TABUCHI, T. et al. Itaconic Acid Fermentation by a Yeast Belonging to the Genus *Candida*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n.2, p. 475-479, 1981.

TAPRE; A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447-453, 2014.

TAYLOR, W. I.; ACHANZAR, D. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. **Applied microbiology**, v. 24, n. 1, p. 58-61, 1972.

TELKE, A. A. et al. Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. **Biodegradation**, v. 21, p.283–296, 2010.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 60, n. 2, p. 140–146, 2008.

TRAN, T. M. et al. Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. **Environmental Microbiology**, 2016. doi:10.1111/1462-2920.13446

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 15, 2016.

VALE, S. C. S.; GUIMARÃES, A. P. M.; MORAIS, P. B. Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* mart ex Spreng. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.4, p. 213-225, 2015. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v2i4.77>

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895–905, 2010.

VANTAMURI, A. B. et al. Isolation and characterization of laccase producing fungi from different environmental samples. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.6, n. 10, p. 6853-6857, 2015.

VARNAITE, R. et al. Enzymatic degradation of lignin-cellulose complex in plant origin material. **Materials Science (MEDŽIAGOTYRA)**, v. 17, n. 1, p. 99-103, 2011.

VISWANATH, B. et al. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.8, p. 1129-1133, 2006.

WANG, R. et al. Substrate Imprinted Lipase Nanogel for One-step Synthesis of Chloramphenicol. **Green Chemistry**, v.15, p. 1155-1158, 2013.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. 3rd edition. New York: Cambridge University Press. 2007.

WEISE, T. et al. Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 579–596, 2012.

WU, A. C. et al. New Perspectives on the Role of α - and β -Amylases in Transient Starch Synthesis. . **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

YANG, J. et al. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-24, 2017.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67–75, 2017.

YUAN, J. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5942-5944, 2012.

ZAIDI, K. U. et al. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. **Biochemistry Research International**, v. 2014, 2014.

ZAKY, A. S. et al. Marine yeast isolation and industrial application. **FEMS Yeast Res**, v. 14, p. 813-825, 2014.

ZHANG, J. et al. iMatch: A retention index tool for analysis of gas chromatography-mass spectrometry data. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6522-6530, 2011.

ZHAO, S. et al. Novel glycoside hydrolases identified by screening a Chinese Holstein dairy cow rumen-derived metagenome library. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6701-6705, 2010.

ZHOU, C.; WU, Q. Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies. **Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications**, v. 2012, p.103-120, 2012. DOI: 10.5772/48727.

ZOU, C., LI, Z., AND YU, D. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 460–466, 2010. doi: 10.1007/s12275-010-0068-z.

APÊNDICE

Meios de cultura utilizados:

Isolamento

NYDA modificado*

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Glicose	10,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Modificação: sem peptona e com 0,5% de extrato de carne em vez de 0,3%
pH 6,3 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

NYDA modificado/1000*

Extrato de carne	5,0	mg
Extrato de levedura	5,0	mg
Glicose	10,0	mg
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Meio NYDA modificado diluído 1000 vezes (exceto Ágar)
pH 6,5 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Coco-Ágar 1 (CA1)

Mesocarpo de coco-verde	400,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Modo de Preparo: bater no liquidificador 100g de mesocarpo sem polpa/ 250 mL de água destilada, filtrar funil com filtro de algodão, adicionar 2% ágar ao filtrado e autoclavar (20 min a 121°C).

Coco-Ágar 2 (CA2)

Poupa de coco-verde	100,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Modo de preparo: misturar manualmente 100 mL de água destilada a 100 g de polpa de coco, aquecer em micro-ondas até levemente quente (40-50°C), filtrar em funil com filtro de algodão, diluir o filtrado 10 vezes, adicionar ágar (20g/L) e autoclavar (20 min a 121°C).

Rosa bengala-Ágar*¹ - estreptomicina

Hidrolisado enzimático de caseína* ²	5,0	g
Rose-bengal	0,05	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
Glicose	1,0	g
Ágar	15,0	g
Sulfato de estreptomicina* ³	37,5	mg
Água	1000,0	mL

pH 5,8 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

*¹ - Rosa bengala-base: retirado da descrição de produto de MpBio (Rose Bengal Agar Base, n° do catálogo: 1008917)

*² - A peptona de soja do meio original foi substituída por hidrolisado enzimático de caseína

*³ - Referência: MARTIN (1950)

Testes bioquímicos e de potencial biotecnológico**Fermentação ácida de carboidratos e outros compostos**

Hidrolisado enzimático de caseína	10,0	g
Substrato testado	5,0	g
NaCl	5,0	g
Vermelho de Fenol	2,5	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

pH 7,2 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Manitol-sal-ágar

Hidrolisado enzimático de caseína	5,0	g
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0	g
Extrato de carne	1,0	g
Cloreto de sódio	75,0	g
D-manitol	10,0	g
Vermelho de fenol	0,025	g
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL

pH 7,4 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Xilanases

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Xilano de madeira de faia	2,5	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL
pH 6,3 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)		

Amilases

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Amido de milho	10,0 ou 2,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL
pH 6,7 ± 0,2 e 6,6 ± 0,2, para 1% e 0,2% de amido respectivamente, após autoclavado (20 min a 121°C)		

Proteases

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Leite desnatado em pó*	10,0	g
Glicose	10,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL
pH 6,9 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)		

*Autoclavado separadamente como solução e adicionado ao meio já autoclavado

Avicelases

KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	g
Celulose microcristalina	2,0	g
Vermelho-congo	0,1	g
Gelatina	2,0	g
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL
pH 6,0 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)		
Referência: GUPTA et al. (2012)		

CMCcases

KH ₂ PO ₄	2,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,39	g
Extrato de levedura	0,4	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0	mg
MnSO ₄	1,6	mg
ZnSO ₄	3,6	mg
CoSO ₄ .7H ₂ O	4,3	mg
CMC de sódio	5,0	g
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL

pH 5,4 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Referência: MANDELS; RESSE (1957), modificado*

*Substituição dos cloretos de zinco e de cobalto (do meio original) por sulfato, mantendo-se as proporções molares dos cátions

Tirosinase

Hidrolisado enzimático de caseína	5,0	g
Extrato de carne	3,0	g
NaCl	5,0	g
L-Tirosina	5,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

pH 6,4 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Referência: RAVAL et al. (2012), modificado*

*Substituição de peptona do meio original por hidrolisado enzimático de caseína

Lipases/esterases

Extrato de carne	10,0	g
NaCl	5,0	g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,11	g
Tween 80*	10,0	g
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL

pH 6,5 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Referência: RAJAN et al. (2011)

*Autoclavado separadamente como solução aquosa

Lacase (meio 1)

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Guaiacol*	1,0	g
Glicose	10,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Adicionado antes do meio ser autoclavado

Lacase (meio 2)

KH ₂ PO ₄	0,6	g
K ₂ HPO ₄	0,4	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
Glicose	10,0	g
Extrato de carne	3,0	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5	mg
MnSO ₄	5,0	mg
ZnSO ₄	1,0	mg
Guaiacol	0,2	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

Referência: VISWANATH et al. (2006)

Lacase (meio 3)

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Guaiacol*	0,5	g
Glicose	10,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

*Adicionado como solução estéril (filtrado em membrana milipore 0,22 µm) ao meio já autoclavado e ainda liquefeito.

DNAses

Hidrolisado enzimático de caseína	15,0	g
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Ácido desoxirribonucleico	2,0	g
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL

pH 7,3 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Polifenoloxidasas

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Ácido Gálico*	1,0	g
Glicose	10,0	g
Ágar	20,0	g
Água	1000,0	mL

pH 5,0 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C) e adição da solução de ácido gálico

*Adicionado em forma de solução autoclavada separadamente

Pectinases

Extrato de levedura	1,2	g
NaCl	0,5	g
Solução CaCl ₂ .2H ₂ O (0,01M)*	10	mL
Sacarose	2,0	g
Ágar	15,0	g
Na ₂ HPO ₄	6,0	g
KH ₂ PO ₄	3,0	g
NH ₄ Cl*	1,0	g
Solução MgSO ₄ .7H ₂ O (1 M)*	1	mL
Pectina	4,0	g
Água	1000,0	mL

pH 6,6 ± 0,2 após autoclavado (20 min a 121°C)

Referência: CATTELAN (1999)

*Soluções autoclavadas separadamente

Degradação de papel de filtro**Meio 1**

KH ₂ PO ₄	0,5	g
Hidrolisado enzimático de caseína	2,0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	g
Água	1000,0	mL

Meio 2

KH ₂ PO ₄	0,5	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	g
Água	1000,0	mL

Meio 3

KH ₂ PO ₄	2,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,39	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0	mg
MnSO ₄	1,6	mg
ZnSO ₄	3,6	mg
CoSO ₄ .7H ₂ O	4,3	mg
Água	1000,0	mL

Meio 4

KH ₂ PO ₄	2,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,39	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0	mg
MnSO ₄	1,6	mg
ZnSO ₄	3,6	mg
CoSO ₄ .7H ₂ O	4,3	mg
Extrato de levedura	0,4	g
Água	1000,0	mL

Descoloração de corante em meio sólido

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Corante testado*	10	mg
Ágar	15,0	g
Água	1000,0	mL

*Vermelho congo, azul de metileno ou rosa bengala

Descoloração de corante em meio líquido**Meio complexo**

Extrato de carne	5,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Glicose	10,0	g
Corante testado*	variável	mg
Água	1000,0	mL

*0,09 mg/mL de azul de metileno

*0,09 mg/mL de rose bengal

*0,28 mg/mL de vermelho congo

Meio sintético

Glicose	10,0	g
KH_2PO_4	2,0	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5	mg
MnSO_4	1,6	mg
ZnSO_4	3,6	mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,3	mg
Corante testado*	variável*	mg
Água	1000,0	mL
*0,09 mg/mL de azul de metileno		
*0,09 mg/mL de rose bengal		
*0,28 mg/mL de vermelho congo		