



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA
LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRUNO ROBERTO DA SILVA QUEIROZ

**PESQUISA DE HIDROLASES DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO
TRATO DIGESTÓRIO DE ISÓPTEROS DA SERRA DE
BATURITÉ- CEARÁ**

**VANESSA LÚCIA RODRIGUES NOGUEIRA
(ORIENTADORA)**

**REDENÇÃO-CEARÁ
2019**

BRUNO ROBERTO DA SILVA QUEIROZ

PESQUISA DE HIDROLASES DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO
TRATO DIGESTÓRIO DE ISÓPTEROS DA SERRA DE BATURITÉ-
CEARÁ

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira

REDENÇÃO-CEARÁ
2019

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Queiroz, Bruno Roberto da Silva.

Q42p

Pesquisa de hidrolases de bactérias associadas ao trato digestório de isópteros da Serra de Baturité-Ceará / Bruno Roberto da Silva Queiroz. - Redenção, 2019.

45f: il.

Monografia - Curso de Ciências Biológicas, Instituto De Ciências Exatas E Da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2019.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira.

1. Biologia - Hidrolases. 2. Isópteros. 3. Maciço de Baturité. I. Título

CE/UF/BSCA

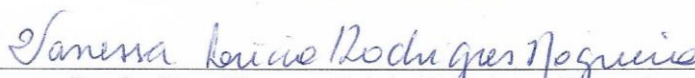
CDD 570

Bruno Roberto da Silva Queiroz

**PESQUISA DE HIDROLASES DE BACTÉRIAS
ASSOCIADAS AO TRATO DIGESTÓRIO DE ISÓPTEROS
DA SERRA DE BATURITÉ- CEARÁ**

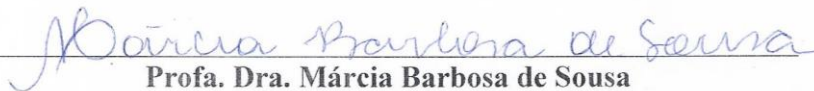
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora



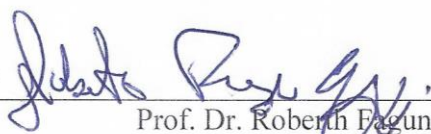
**Prof. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira
(Orientadora)**

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira Ciências
Biológicas – ICEN/UNILAB



**Prof. Dra. Márcia Barbosa de Sousa
(Examinadora)**

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira Ciências
Biológicas – ICEN/UNILAB



**Prof. Dr. Robert Fagundes de Souza
(Examinador)**

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira Ciências
Biológicas – ICEN/UNILAB

DEDICATÓRIA

À minha família.
À todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio, compreensão, e por me encorajar em vários momentos.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), por ceder a estrutura laboratorial e equipamentos.

Ao Curso de Ciências Biológicas, pelo apoio institucional, didático e construtivo.

Ao Programa de Assistência ao Estudante (PAES) da UNILAB, pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora profa. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira, pelas oportunidades de aprendizado, pela compreensão, paciência e excelente orientação.

Aos professores participantes da Banca examinadora Márcia Barbosa e Roberth Fagundes, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica.

A todos os técnicos dos laboratórios e em especial Livia Coelho, Tatyane Barros, Roberta Tayane, Débora Menezes, Sarah Medeiros, Henrique Pinho, e Camila Peixoto pelos conselhos, e pelas excelentes colaborações.

Aos colegas de laboratório Gabriela, Geovana, Clara e Rubson pelo companheirismo, e pelos momentos de discussão e reflexão.

A todos os colegas de turma e em especial aos colegas Jossiane, Márcia, Tacila, Jesica, Emily, Edilane, Vitória, Izabely, e Ageu pela amizade.

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano”

Isaac Newton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Potencial biotecnológico dos micro-organismos.....	20
2.2	Hidrolases.....	22
2.3	Técnicas de estudo dos microrganismos	30
2.3.1	<i>Isolamento dos microrganismos</i>	30
2.3.2	<i>Caracterização morfológica dos isolados</i>	31
2.4	Simbiose entre microrganismos e cupim.....	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Caracterização da área de coleta	34
4.3.	Isolamento e cultivo de bactérias associadas ao trato digestório de isópteros	35
4.4.	Caracterização morfológica dos isolados	37
4.5.	Pesquisa da produção de hidrolases em meio sólido.....	38
4.5.1.	<i>Amilase</i>	38
4.5.2.	<i>Protease</i>	39
4.5.3.	<i>Celulase</i>	39
4.5.4.	<i>Lipase</i>	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Isolamento e cultivo de bactérias associadas	39
5.2.	Produção de hidrolases por bactérias associadas ao trato digestório de cupins	42
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

As hidrolases são enzimas que catalisam a quebra de moléculas orgânicas utilizando água, entre elas as amilases, proteases, celulasas e lípases, cuja aplicação é de interesse em diversos bioprocessos como na indústria de alimentos, têxtil, fármacos, biocombustíveis entre outras. Os isópteros são uma fonte excepcional de microrganismos produtores de enzimas, sua dieta diversa e nutricionalmente pobre exige um pool de enzimas necessários a digestão mais eficiente possível dos compostos lignocelulósicos e proteicos de sua dieta. Neste contexto, tendo em vista a extensa literatura descrevendo uma bacteriofauna diversa associada ao trato digestório de cupins (isóptera) auxiliando na digestão de diversos compostos da sua dieta, este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar a bacteriofauna do trato digestório de isópteros e avaliar sua capacidade de produção de hidrolases de interesse em processos biotecnológicos. Para tal, foram dissecados os intestinos de 10 indivíduos da amostra de isópteros e cultivados as bactérias heterotróficas ali presentes. Os isolados obtidos foram submetidos ao crescimento em meios específicos para detecção das quatro enzimas testadas. Entre os isolados testados 40 % foram capazes de degradar amido, 55% caseína e 25% celulase, no entanto, nenhum dos isolados foi capaz de degradar lipídeos nas condições testadas. Posteriormente a espécie de isópteros utilizada neste estudo será identificada e as cepas mais promissoras será feita a identificação molecular por meio do sequenciamento do RNA ribossomal 16S. Estudos mais detalhados precisam ser feitos a fim de isolar, purificar e caracterizar a atividade biológica das hidrolases detectadas e analisar seu potencial de aplicação em bioprocessos.

PALAVRAS-CHAVE: hidrolases, isópteros, Maciço de Baturité, biotecnologia

ABSTRACT

Hydrolases are enzymes that catalyze the breakdown of organic molecules using water, including amylases, proteases, cellulases and lipases, whose application is of interest in various bioprocesses such as the food industry, textiles, pharmaceuticals, biofuels and others. Isopters are an exceptional source of enzyme-producing microorganisms, their diverse and nutritionally poor diet requires an enzyme pool necessary for the most efficient digestion of the lignocellulosic and protein compounds in their diet. In this context, in view of the extensive literature describing a diverse bacteriofauna associated with the termite digestive tract (isoptera) assisting in the digestion of various compounds of their diet, this study aimed to isolate and characterize the bacteriofauna of the isopteran digestive tract and evaluate its hydrolases production capacity of interest in biotechnological processes. For this, the intestines of 10 individuals from the isoptera sample were dissected and the heterotrophic bacteria present therein were cultivated. The isolates obtained were submitted to growth in specific media to detect the four enzymes tested. Among the isolates tested 40% were able to degrade starch, 55% casein and 25% cellulase, however, none of the isolates were able to degrade lipids under the tested conditions. Later the species of isoptera used in this study will be identified and the most promising strains will be molecularly identified by 16S ribosomal RNA sequencing. More detailed studies need to be done in order to isolate, purify and characterize the biological activity of the detected hydrolases and analyze their potential application in bioprocesses.

KEYWORDS: Hydrolases, termites, Maciço de Baturité, biotechnology

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos de interesse industrial envolvem em grande maioria a produção de enzimas dos mais variados tipos e funções, e as bactérias são amplamente utilizadas no processo de produção dessas enzimas, seja por expressão heteróloga, seja por cultivo de cepas que naturalmente produzem as enzimas de interesse. As enzimas são substâncias orgânicas com estrutura molecular altamente específica compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Segundo HARGER (1982), enzimas são catalisadores biológicos de estrutura proteica globular terciária ou quaternária, termolábeis, que aceleram a velocidade de uma reação química termodinamicamente viável, sendo assim, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas da classe das hidrolases catalisam reações de quebra em meio aquoso, utilizando a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas e são amplamente utilizadas em bioprocessos industriais, podendo ser aplicadas na degradação de diversas substâncias naturais. Em geral são utilizadas em setores como nas indústrias têxteis (amilases, celulasas, pectinases), de detergentes (celulasas, lipases, proteases), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease), de papel (lipase, xilanase), de couro (lipase, protease), entre outras (OLIVEIRA et al., 2006).

O setor energético também tem investido fortemente em pesquisas para produção de biocombustíveis como o bioetanol e biodiesel a partir da hidrólise enzimática da biomassa vegetal de cana-de-açúcar, mamona e soja entre outros.

Atualmente, há um grande interesse na utilização dos resíduos agroindustriais como o bagaço da cana-de-açúcar, devido à alta demanda por produtos de atividades agrícolas, pois o acúmulo desses resíduos poderá levar a degradação do meio ambiente e perda de recursos naturais, com contribuição para o problema da reciclagem de matéria orgânica e conservação da biomassa vegetal.

Diversos processos biotecnológicos estão em desenvolvimento para a utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e bioprodutos com alto valor agregado como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e outros (PANDEY *et al.*, 2000; PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009). A prospecção de microrganismos com potencial biotecnológico para a produção dessas hidrolases, utilizando resíduos agrícolas e industriais como substrato, tem se mostrado uma alternativa viável em um país como o Brasil que apresenta uma produção agrícola expressiva e elevada taxa de Biodiversidade,

umentando em muito a possibilidade de obtenção de novas fontes microbianas produtoras de enzimas, contribuindo dessa forma para a redução do custo final da produção dessas enzimas (BUCKERIDGE, 2008).

Dentre as enzimas de interesse em bioprocessos, produzidas por microrganismos, foram abordadas neste estudo as celulases, amilases, lipases e proteases. A biotecnologia contemporânea tem investido esforços na produção dessas enzimas, haja visto que são compostos de alto valor comercial devido as suas funções em diversos bioprocessos. Os microrganismos tem sido os principais produtores de enzimas utilizados na indústria devido as suas propriedades de alta taxa metabólica e sua capacidade quase ilimitada de sintetizar diversos compostos bioativos. Estudos de bioprospecção de enzimas e compostos bioativos tem sido o enfoque da biotecnologia de recursos naturais na busca por essas moléculas em diversos organismos, no entanto, ainda há uma alta diversidade a ser explorada. A região do maciço de Baturité no estado do Ceará, abriga uma pequena área de mata atlântica cujos recursos naturais são pouco estudados. Não há na literatura trabalhos descritivos ou investigativos acerca da diversidade microbiana para essa área, portanto, se mostra com uma área que potencialmente abriga grande diversidade genética ainda inexplorada e que pode render resultados animadores para a pesquisa em tecnologia enzimática e na aplicação biotecnológica dos achados. Este estudo, então, empenhou-se no estudo do potencial enzimático da bacteriofauna do trato digestivo de isópteros tendo em vista a extensa literatura descrevendo microrganismos associados ao trato digestivo desses animais com o papel de auxiliá-los na síntese de enzimas que participam na digestão de diversos compostos da sua dieta, e que são de interesse em diversos bioprocessos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Potencial biotecnológico dos micro-organismos

A bioprospecção de micro-organismos tem sido o principal foco da biotecnologia atualmente, tendo em vista o potencial de utilização destes organismos e/ou seus produtos em diversos setores industriais, na saúde e meio ambiente, com elevado crescimento nos últimos anos. (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2007). Os microrganismos figuram atualmente entre as principais fontes de produção de enzimas de interesse industrial, devido a algumas características interessantes para produção de enzimas como a grande quantidade de produto gerado em tempo relativamente curto, a

não dependência de condições ambientais e geográficas apropriadas e gasto reduzido no uso de matérias primas (ZIMMER *et al.*, 2009). O elevado potencial biotecnológico dos microrganismos está relacionado a sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas. A busca de princípios bioativos de microrganismos tem recebido investimentos maciços em países desenvolvidos, principalmente nas pesquisas de bioprospecção realizadas pelas indústrias farmacêuticas (PINTO *et al.*, 2002). A grande diversidade metabólica dos microrganismos explica sua extraordinária atividade e os torna uma fonte importante de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (BURKE, 2011; DELABONA, 2011).

A luz das recentes descobertas da genética, da fisiologia e do metabolismo microbiano surge a biotecnologia moderna. Entre os benefícios científicos e econômicos esperados, inclui-se a descoberta de novos fármacos, produtos químicos, enzimas e polímeros de interesse industrial, biorremediação de poluentes entre outros. (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2007). Os avanços atuais na biotecnologia, deve-se em muito a sistemática e a ecologia microbiana, a bioinformática, a genômica, a metagenômica, bem como os centros de recursos biológicos e o perfil das novas empresas de base tecnológica (CANHOS; MANFIO, 2003) As enzimas de origem microbiana estão, atualmente entre os principais produtos naturais de interesse biotecnológico. Utilizando-se de manipulação genética de micro-organismos é possível a produção de qualquer enzima, com isso a tendência no futuro é que todas as enzimas utilizadas industrialmente sejam de origem microbiana (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As enzimas são catalisadores biológicos extraordinários, ou seja, aumentam a velocidade de reações químicas sem interferir no processo, pois não são consumidas na reação e não alteram o equilíbrio químico da mesma. Deve-se ressaltar que as enzimas são biocatalisadores preferenciais em relação aos catalisadores químicos clássicos, pois são muito eficientes e ambientalmente compatíveis, apresentam elevada especificidade, estabilidade reacional e algumas funcionam independentes de cofatores (LORENZ; SCHLEPER, 2002). Enzimas de origem microbiana têm sido utilizadas comercialmente há décadas. No entanto, apesar do desempenho promissor em laboratório, a aplicação dessas enzimas em escala industrial ainda é limitada (BELOQUI *et al.*, 2008). Esta limitação deve-se principalmente à falta de moléculas disponíveis que possam realizar

reações químicas desejáveis, principalmente pelo número de enzimas microbianas disponíveis ainda limitado, devido à maioria dos micro-organismos não ser cultivável em laboratório (VIEITES *et al.*, 2009).

2.2 Hidrolases

As enzimas apresentam diferentes classes, entre elas a classe das hidrolases, que incluem as lipases, esterases, proteases, amilases, celulase e outras, que destacam-se devido a sua ampla especificidade de substrato, alta estereoespecificidade e regioseletividade, independência de cofatores e estabilidade e atividade em solventes orgânicos (LÄMMLE *et al.*, 2007). As hidrolases constituem mais de 75% do mercado das enzimas industriais comercializadas (BHAT, 2000). No entanto, considerando a demanda de mercado, as lipases são o terceiro maior grupo de enzimas comercializadas após proteases e carboidrases como a amilase e celulase, com uma perspectiva de grande crescimento nos próximos anos, e representam um bilhão de dólares por ano (CASAS-GODOY *et al.*, 2012; SARROUH *et al.*, 2012).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato específico sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica o amido como o substrato da enzima (HARGER, 1982). As amilases são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido, gerando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2005). As amilases formam um dos mais importantes e antigos grupos de enzimas de interesse industrial com aplicações em diferentes ramos industriais, como alimentos, têxtil, química, farmacêutica e detergentes (NANDY, 2016).

O interesse industrial na produção de glicose a partir de materiais amiláceos impulsionou a produção de amilases no começo do século passado. Takamine desenvolveu um método pioneiro para a produção microbiológica, em larga escala, da enzima α -amilase fúngica, denominada Takadiastase (TAKAMINE, 1914). As técnicas e os processos utilizados para este fim, desde então, foram aprimorados. As enzimas amilolíticas são responsáveis por 25-33% do mercado mundial de enzimas, vindo em segundo lugar, após as proteases (NGUYEN *et al.*, 2002).

Dentre as enzimas com atividades amilolíticas, a mais importante é a α -amilase, pois desempenha um papel fundamental na hidrólise do amido gerando produtos de baixo

peso molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo. As enzimas amilolíticas compreendem as hidrolases, que convertem as moléculas de amido em produtos, como dextrinas, e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003). Conforme o seu modo de ação, as amilases podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação tem como resultado a formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases catalisam a quebra sucessiva de ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (GUPTA et al., 2003).

Dentre as aplicações mais relevantes, destaca-se a etapa de liquefação do amido no processo de produção de açúcar, álcool e cerveja. Entretanto, as amilases têm conquistado um amplo espectro de aplicações industriais, sendo também utilizadas na produção de detergentes, na indústria têxtil, panificadora e farmacêutica, no tratamento de esgotos e na alimentação animal (KHEMAKHEM et al., 2013). As enzimas proteolíticas formam um dos grupos mais importantes de enzimas produzidas comercialmente (UYAR & BAYSAL, 2004), e são conhecidas como proteases. As proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas e são de fundamental importância para o metabolismo e para o sucesso dos processos fisiológicos necessários à manutenção da vida. Além disso, em condições patológicas, realizam funções síntese e degradação e executam uma larga variedade de funções celulares e orgânicas, produzindo sistemas de cascata tais como hemóstase e inflamação (RAO et al, 1998, TOSHIHIKO et al, 1999).

Estima-se que cerca de 2% do genoma dos seres vivos codificam proteases, as quais são responsáveis por diferentes funções, desde a regulação de processos fisiológicos e patológicos, degradação de proteínas, defesa contra invasores, entre outras. A produção destas macromoléculas é regulada por mecanismos de controle da expressão gênico, produção de zimogêneos, ou ativação e inibição enzimática (GARCIA-CARRENO & DEL TORO, 1997). A grande variedade de proteases em contraste com sua alta especificidade de ação tem atraído atenção mundial devido à possibilidade de sua exploração para aplicações médicas e biotecnológicas (TUNGA *et al.*, 2003). Dentre estas se destacam as proteases alcalinas, que são utilizadas principalmente como aditivos para a indústria de detergentes (BANERJEE et al.,1999). As proteases são fisiologicamente

necessárias a sobrevivência de todos os seres vivos (RAO et al., 1998), elas podem ser obtidas de diversas fontes como animais, plantas, fungos e bactérias. Embora as proteases microbianas, geralmente, sejam produzidas em cultura submersa, culturas sólidas também tem sido utilizadas em um menor grau para produção dessas enzimas (GEORGE et al., 1995)

De acordo com Gacesa e Hubble (1990), é possível identificar uma série de etapas ao longo do desenvolvimento da indústria enzimática. Inicialmente, as preparações eram obtidas basicamente de extratos animais e vegetais com pequena contribuição microbiana. O aumento da demanda por enzimas microbianas surgiu devido uma limitação de materiais animais e vegetais que até então eram as principais fontes de enzimas, a partir de então começam a ser utilizadas enzimas microbianas em larga escala. A natureza é abundante em microrganismos dos quais apenas uma pequena fração é atualmente conhecida, daí o interesse em estudar e prospectar microrganismos nestes ambientes. A terra e a água são as principais fontes de microrganismos. Um grama de solo pode conter milhões e milhões de bactérias, fungos e outros organismos. Amostras são coletadas em todo o mundo, desde a tundra ártica até fontes termais. Mas, os microrganismos que produzem enzimas estão presentes também em lugares comuns. De uma amostra de solo do Jardim Botânico de Copenhagen na Dinamarca foi isolado o microrganismo que produz uma das enzimas utilizadas atualmente para extrair açúcar do amido (NOVOZYME, 2002). A ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética dos microrganismos, os tornam uma excelente fonte de enzimas. Com isso as proteases microbianas respondem hoje por aproximadamente 40% do mercado mundial de enzimas, sendo preferidas em relação às de animais ou de plantas, por apresentarem quase todas as características desejáveis para sua aplicação biotecnológica (Rao *et al.*, 1998; KUMAR e TAKAGI, 1999).

Quando comparadas as enzimas de plantas e animais, as enzimas microbianas tem muitas vantagens devido à sua grande variedade catalítica, além de serem obtidas em elevadas quantidades, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade. Além disso, apresentam maior estabilidade que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (WISEMAN, 1985). Os métodos de obtenção destas enzimas podem ser facilmente otimizados e as proteases microbianas podem ser mantidas sob armazenamento por um

longo período, não necessariamente em suas condições ótimas de atuação, sem perda significativa de sua atividade (Gupta *et al.*, 2002a).

Dentre os microrganismos, as bactérias são os principais produtores de proteases, com destaque para o gênero *Bacillus* sp. (Haki e Rakshit, 2003). As enzimas de origem microbiana podem ser intracelulares ou extracelulares. As proteases intracelulares participam em vários processos metabólicos e celulares, como na esporulação, diferenciação, e manutenção do “pool” de proteínas intracelular, enquanto que as proteases extracelulares são importantes para a hidrólise de proteínas no meio externo, permitindo a absorção dos nutrientes pelos microrganismos (Gupta *et al.*, 2002b). Gacesa e Hubble (1990) e Wiseman (1985) afirmam que as enzimas extracelulares possuem uma série de vantagens sobre as intracelulares. Por serem secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular que são de difícil aplicação em larga escala, deve-se considerar também como vantagem o número limitado de enzimas secretadas, sendo relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento e por fim, as enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares. As enzimas microbianas extracelulares, devido à sua secreção direta no meio de crescimento, também apresentam vantagens sobre as proteases de origem animal ou vegetal (Gupta *et al.*, 2002a). Atualmente, as proteases microbianas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, indústria têxtil e farmacêutica, na produção de detergentes (biológicos), química bio-orgânica, biologia molecular e aplicações médicas. A ampla utilização destas enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalizadores (Phadataré, *et al.*, 1993, Mandigan *et al.*, 1996; Horikoshi, 1999; Kanekar, *et al.*, 2002).

A celulose é a molécula orgânica mais abundante na Terra e é o principal componente estrutural das plantas. É um homopolímero fibroso, insolúvel e de alto peso molecular de unidades de glicose anidra ligadas pelas ligações glicosídicas β -1, 4. É o principal constituinte da biomassa lignocelulósica, que é um material orgânico renovável de baixo custo e inesgotável na natureza e tem um potencial significativo como fonte alternativa de combustível e substâncias químicas de base biológica. Na biomassa lignocelulósica, as fibras de celulose estão embebidas em uma matriz de diferentes biopolímeros, incluindo hemiceluloses e lignina (LYND *et al.*, 2008)

Estruturalmente, longas cadeias de celulose são agrupadas por numerosas ligações cruzadas, tais como interações de hidrogênio e vander Waal para embalar a celulose em

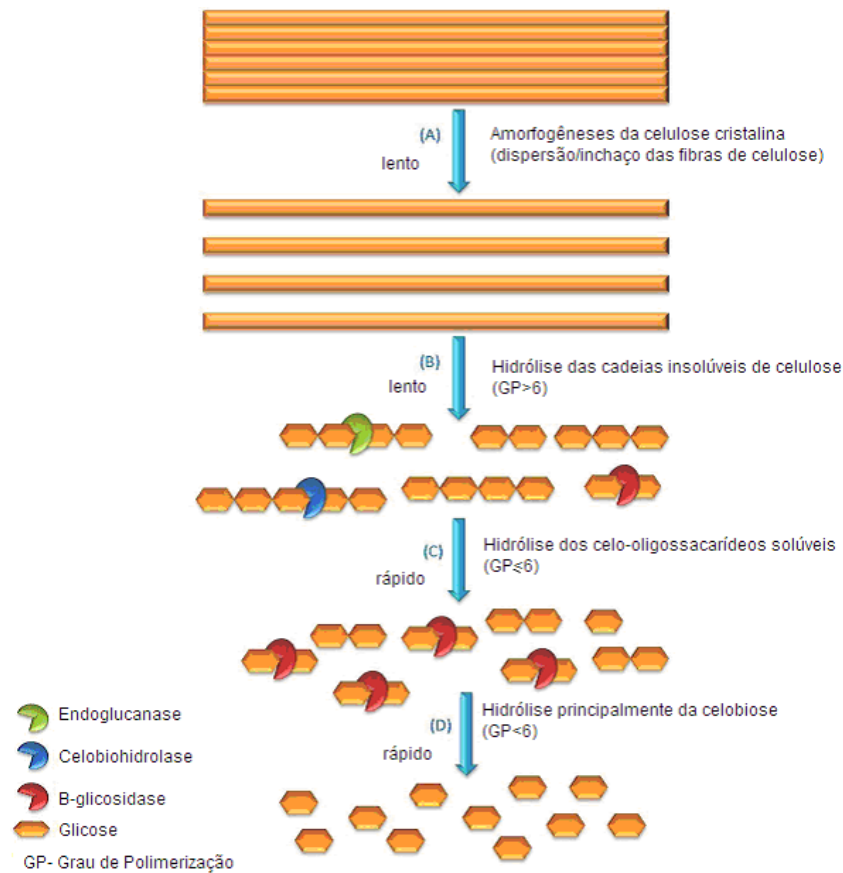
microfibrilas. O arranjo paralelo de cadeias de celulose resulta no desenvolvimento da região cristalina enquanto a região amorfa da estrutura da celulose é devido ao arranjo menos ordenado das correntes (SAHA, 2000 e LI X-H et al., 2009). O grau de polimerização da cadeia de celulose é altamente variável, variando de 250 a 10000 e influencia as propriedades fisiológicas, mecânicas e biológicas da celulose. O comprimento da cadeia de celulose ou grau de polimerização depende da fonte de material e métodos de tratamento (SANTOS et al., 2016 e KOLAKOVIC, 2013)

A celulose é o principal constituinte da biomassa lignocelulósica e também considerada o mais forte candidato potencial para a produção sustentável de combustível, devido às suas características favoráveis ao meio ambiente, tais como renovabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Celulase é o nome dado a um complexo de enzimas que apresentam atividades hidrolíticas sobre materiais lignocelulósicos liberando açúcares, dos quais, o de maior interesse industrial é a glicose, devido a possibilidade de sua conversão em etanol por meio de processos fermentativos. Dessa forma, são classificadas de acordo com o local de atuação da enzima no substrato celulósico, sendo estas: as endoglucanases, as que clivam ligações glicosídicas β -1,4 internas da fibra celulósica; as exoglucanases, as que atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases, que hidrolisam celo-oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO e PEREIRA, 2010). A atuação conjunta das enzimas celulolíticas apresenta um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6. A etapa de despolimerização realizada por EGases e ExGases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobiose em glicose pelas β -glicosidases, embora algumas β -glicosidases também hidrolisem celodextrinas (ZHANG e LYND, 2004). As celulases possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997).

O mercado de celulases deverá expandir-se dramaticamente quando as celulases forem usadas para hidrolisar materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares, que

podem ser fermentados para *commodities* como o etanol de 2ª geração e produtos com base biológica em larga escala (CHERRY e FIDANTSEF, 2003; HIMMEL et al., 1999; VAN BEILEN e LI, 2002). As enzimas do complexo celulolítico são indispensáveis no processo de transformação de biomassa lignocelulósica e a produção de etanol e bioproductos. No entanto, o alto custo destas enzimas, apresenta um obstáculo significativo à comercialização de etanol e produtos químicos. Devido à heterogeneidade e complexidade da biomassa lignocelulósica, a bioconversão demanda inúmeras atividades enzimáticas. Um sistema de enzimas eficiente e de baixo custo deve conter atividades balanceadas de celulasas (endo, exoglucanases e β -glicosidade), xilanase, entre outras (BRIJWANI et al., 2010). A redução dos custos das enzimas é importante para a aplicação comercial em biorrefinarias. Estratégias baseadas na utilização de celulasas em biorrefinarias para um processamento econômico incluem: aumento da produtividade volumétrica das enzimas comerciais, produção das enzimas a partir de substratos mais baratos, produção de coquetéis enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos, além de produzir celulasas com maior atividade específica sobre substratos sólidos (ZHANG et al., 2006)

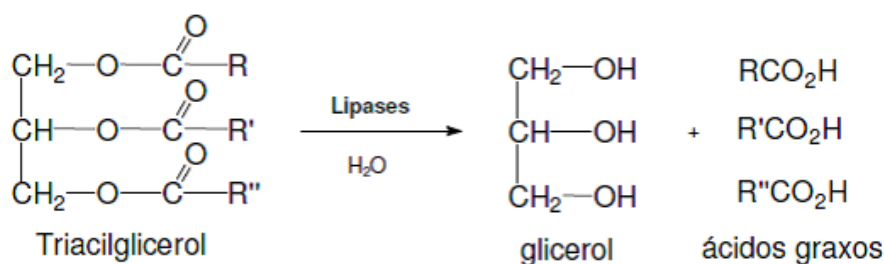
Figura 1. Ação sinérgica das celulases.



Fonte: Adaptado de Arantes e Sadler (2010).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas da classe das hidrolases que "in vivo" catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 1), constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Diaz *et al.*, 2006; Jaeger e Eggert, 2002). As lipases atuam também "in vitro" como catalisadores de diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais moderadas, incluindo-se as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, quando a quantidade de água no sistema em que estão presentes é baixa o suficiente para deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Foresti e Ferreira 2006; Ghanem e Aboul-Enein, 2004; Rassy *et al.*, 2004; Gotor *et al.*, 2002, Krishna e Karanth 2001).

Figura 2. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.



Fonte: SILVA, 2011

Dentre os processos bioquímicos descritos na literatura, as lipases representam cerca de 35% das enzimas utilizadas. Seguida pelas proteases e amilases, esse grupo de enzimas é responsável pelo terceiro maior volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. No entanto, apesar da variedade de lipases microbianas disponíveis hoje, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é limitado pelos elevados custos de produção (PAQUES e MACEDO, 2006). As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos, embora estas sejam também produzidas plantas e animais. Tanto micro-organismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SAXENA et al., 2003). Em comparação com lipases de plantas e animais, as lipases bacterianas são mais estudadas. Apresentam-se como glicoproteínas em sua maioria, no entanto algumas lipases extracelulares bacterianas são lipoproteínas. As lipases de *Pseudomonas* foram provavelmente as primeiras a serem estudadas e têm papel importante nas indústrias. Outras bactérias, como *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Staphylococcus* sp., e *Chromobacterium* sp. também foram utilizadas para a produção de lipases. Para as lipases bacterianas o pH ótimo situa-se entre 4,0 e 10,0; a temperatura varia de 27 a 80°C e o peso molecular varia de 11 a 176 kDa (PATIL et al., 2011).

As lipases desempenham papel importante na degradação de materiais naturais, poluentes industriais e outros produtos tóxicos, também possuem potencial de aplicação na agricultura, indústrias de alimentos e farmacêutica (PANDA & GOWRISHANKAR, 2005). O crescente mercado de lipases exige a identificação e isolamento de novos micro-organismos produtores com maiores taxas de produção com o objetivo de reduzir custos, afim de aumentar a produtividade e obter enzimas com diferentes propriedades. Os estudos científicos tem cada vez mais destacado a procura por novas fontes de

microrganismos produtores de lipases avaliando as aplicações futuras que requerem não somente a especificidade enzima-substrato, como também a estabilidade do processo, tal como a tolerância a altas taxas de pH e temperatura (SHU, XU e LIN, 2006)

Para a seleção de microrganismos produtores de enzimas, empregam-se métodos de detecção qualitativos ou quantitativos (GUPTA et al., 2004). Um dos métodos qualitativos empregados na detecção de atividade lipolítica consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia, devido as substâncias adicionadas ao meio, que podem ser baseados em Tween 20, Tween 80, tributirina e óleo de oliva (GUPTA et al., 2004 e FREIRE, 1996). Os microrganismos se mostram atualmente como as principais fontes de produção de enzimas usadas industrialmente, devido a algumas características interessantes para produção de enzimas como a grande quantidade de produto em tempo relativamente curto, a não dependência de condições ambientais e geográficas apropriadas e gasto reduzido no uso de matérias primas (ZIMMER *et al.*, 2009). As fontes de enzimas são diversas e específicas para cada objetivo a ser utilizada. Enzimas lipolíticas e surfactantes tem sido detectadas em comunidades microbianas isoladas de óleos, petróleo e derivados com o objetivo de aplicação na biorremediação de áreas contaminadas com petróleo. Da mesma forma enzimas capazes de degradar materiais lignocelulósicos tem sido prospectadas de comunidades microbianas isoladas de diferentes fontes como o rúmen de animais ruminantes (BERCHIELLI, 2006), trato de digestivo de isópteros (INOUE et al., 1997), e entre outros .

2.3 Técnicas de estudo dos microrganismos

2.3.1 Isolamento dos microrganismos

Um dos primeiros procedimentos necessários para se realizar estudos sobre microrganismos é a obtenção de culturas puras, que são adquiridas através do isolamento. Os métodos mais eficientes para o isolamento de micro-organismos, chamados métodos de plaqueamento só foram possíveis com o desenvolvimento de meios de cultura sólidos. O princípio geral desses métodos reside no fato de que uma célula viável, ao ser colocado em um meio adequado, cresce, originando uma colônia visível a olho nu. Essa colônia pode ser então, transferida para novo meio onde se multiplicará livre da presença de outros micro-organismos, obtendo-se, desta forma, uma cultura pura (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

Culturas puras de micro-organismos têm sido empregadas há mais de 100 anos em bioprocessos, e mesmo com o passar do tempo sua importância econômica continua a ser enorme. As reações catalisadas por micro-organismos possuem um elevado valor agregado na indústria química (€ 10 bilhões), sendo que nos próximos 10 anos estima-se que 60% do segmento da química fina sejam baseados nas conversões microbianas (LYND *et al.*, 2008).

2.3.2 Caracterização morfológica dos isolados

A avaliação das características morfológicas é o primeiro passo para a identificação de um novo grupo taxonômico de micro-organismos. Essas características podem identificar diferenças fisiológicas importantes em micro-organismos, os quais podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (PELCZAR *et al.*, 1981).

Características culturais relevantes que podem ser avaliadas são o tempo de formação de colônias isoladas e alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como identificador de diferenças fisiológicas entre gêneros (JORDAN, 1984; MOREIRA; PEREIRA, 2001). Além destas, outras características utilizadas são produção de exopolissacarídeos, tamanho, cor, borda, forma e aspecto da colônia. (VINCENT, 1970; MOREIRA *et al.*; 1993, ODEE *et al.*, 1997)

2.4 Simbiose entre microrganismos e cupim

Os insetos compõem a classe mais abundante de animais no planeta, com mais de um milhão de espécies conhecidas. Estima-se que 20% dos insetos abriguem algum microrganismo simbiótico de forma mutualista. A simbiose contribui para o sucesso ecológico dos insetos fornecendo vantagens nutricionais ou proteção. Alguns simbiontes são encontrados na superfície externa dos insetos ou em seu trato digestório. *Endossimbiontes* são bactérias intracelulares, e estão localizadas geralmente em órgãos especializados dos insetos (MICROBIOLOGIA DE BROCK, 2016). A relação simbiótica de microrganismos que habitam o trato digestivo de insetos com seu hospedeiro é conhecida desde 1929 (WIGGLESWORTH, 1929). Insetos submetidos a dietas pobres em nutrientes, como madeira e húmus, necessitam de bactérias simbiontes para auxiliarem na síntese de aminoácidos e fixação de nitrogênio atmosférico (TERRA, 1990). De acordo com o tipo de dieta a qual um inseto é submetido, enzimas diferenciadas, ou seja, aquelas que não são comumente produzidas pelo inseto, são

necessárias para o sucesso do processo digestivo (KAUFMAN & KLUG, 1991; SANTO-DOMINGO et al., 1998)

Os microrganismos endossimbiontes relacionam-se ecologicamente com seu hospedeiro de formas essenciais, como as mutualísticas, e não benéficas como as patogênicas. Muitos deles apresentam-se como componentes obrigatórios da bacteriofauna intestinal sendo incapazes de sobreviver fora do hospedeiro (DILLON & DILLON, 2004). A interação entre insetos e microrganismos é essencial quando consideramos a capacidade desses microrganismos de decompor e modificar compostos químicos presentes em vegetais ingeridos pelos insetos em sua dieta, diminuindo assim, o efeito tóxico dessas substâncias no hospedeiro (CAMPBELL, 1990; DOUGLAS, 1992; DILLON & DILLON, 2004; GENTA et al., 2006; TERRA & FERREIRA, 2005). Pode-se definir a simbiose como uma relação íntima entre inseto e microrganismo, onde a obtenção e manutenção desses microrganismos podem resultar em novas estruturas e em novas vias metabólicas (ZOOK, 1998). Os endossimbiontes podem ser obrigatórios ou facultativos e essa classificação tem relação com o grau de dependência do inseto em relação ao microrganismo simbiote. Simbiontes obrigatórios normalmente estão associados a estruturas especiais de seu hospedeiro, os bacteriócitos ou micetócitos, são transmitidos verticalmente e sua associação é crucial para a sobrevivência e/ou reprodução do hospedeiro (BAUMANN, 2005). Já os simbiontes facultativos podem ser encontrados em diferentes tecidos do hospedeiro, podendo ser transmitido vertical ou horizontalmente, mantendo relações de simbiose com o inseto que podem variar entre mutualismo e parasitismo (MORAN; BAUMANN, 2000; BAUMANN, 2006; SIOZIOS et al.; 2008).

Wolbachia é o exemplo mais conhecido de endossimbiose inseto-microrganismo, induzindo alterações reprodutivas tais como: (1) incompatibilidade citoplasmática direcional ou bidirecional, quando não há produção de progênie; (2) indução de telitoquia, na qual ovos haploides originam indivíduos diploides do sexo feminino; (3) feminização, quando machos genéticos são convertidos em fêmeas funcionais (ZCHORI-FEIN et al., 2004; SERBUS et al., 2008).

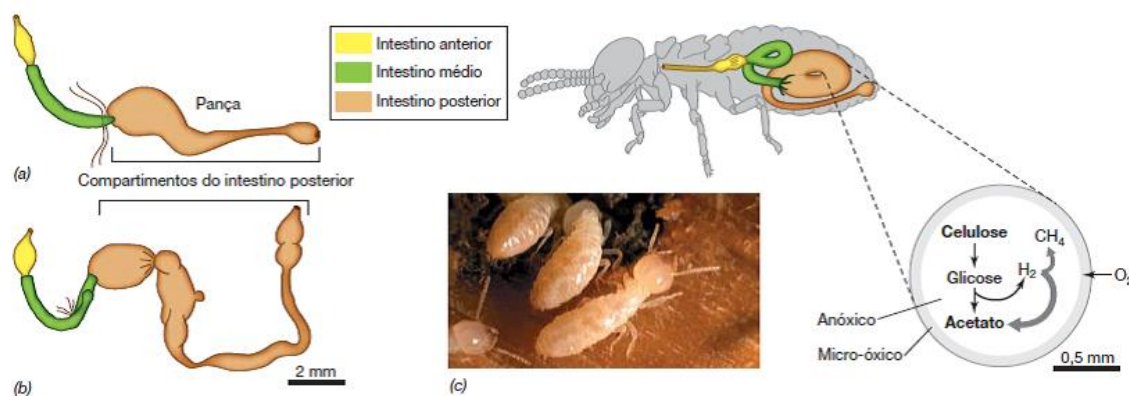
Os insetos também podem abrigar simbiontes extracelulares, os quais podem ser encontrados em diversas partes do corpo do hospedeiro, principalmente no trato digestório. Diversos fatores influenciam diretamente na colonização do trato intestinal de insetos, uma vez que a diversidade da microbiota está relacionada com estruturas

especializadas no intestino, o tipo de alimento ingerido pelo inseto e as enzimas necessárias para digestão deste alimento, além do efeito do pH e do potencial redox. A figura 3 demonstra a estrutura e as regiões do trato digestório de isópteros, Dillon e Dillon (2004) observaram que insetos que apresentam trato digestivo com estruturas e compartimentalização mais complexas, também apresentam microbiota intestinal mais diversa quando comparados aqueles com estruturas mais simples

Os cupins ou térmita são insetos eusociais da ordem Isoptera, com cerca de 2.800 espécies descritas no mundo. No Brasil, as principais famílias encontradas são: Kalotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, Termitidae e Serritermitidae, entre as quais apenas Kalotermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae são de importância econômica (GALLO et al., 2002). Os cupins podem ser considerados insetos benéficos, pois atuam na decomposição da matéria orgânica e colaboram na ciclagem dos nutrientes e na aeração do solo. Entretanto, também podem se destacar como pragas de espécies florestais e algumas culturas agrícolas, como milho, cana-de-açúcar, arroz, mandioca, entre outras.

Os organismos biodeterioradores apresentam características morfológicas, fisiológicas e comportamentais especiais que os tornam capazes de utilizar a material lignocelulolítico como substrato, abrigo e alimento. Nesse contexto, destaque especial é dado aos cupins ou térmitas que, por causa da capacidade de digerir celulose proporcionada por fauna microbológica simbiote presente em seu intestino, são atraídos por todo o material de origem celulósica, como a madeira em seu estado bruto, papel, tecidos e outros (GRACE, 1982; OLIVEIRA et al., 1976).

Figura 3: Esquema mostrando a morfologia do aparelho digestório de isópteros



Fonte: Microbiologia de Brock, 2016

Os isópteros são fontes excepcionais de microrganismos produtores de enzimas. Os diferentes recursos alimentares explorados por esses organismos são de baixo valor nutricional e difícil digestão (Waller & La Fage 1986), requerendo um “pool” de enzimas para digestão mais eficiente possível desses compostos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a bioprospecção de bactérias produtoras de hidrolases associadas ao trato digestivo de cupins (*Isoptera*) de uma área da APA (área de proteção ambiental) da Serra de Baturité para futuras aplicações biotecnológicas.

3.2 Objetivos específicos

- I. Coletar espécimes de cupins da região da Serra de Baturité;
- II. Isolar cepas bacterianas associadas ao trato digestório;
- III. Caracterizar morfologicamente os isolados do trato intestinal de isópteros;
- IV. Avaliar a capacidade de produção de hidrolases (amilases, proteases celulases, e lipases) dos isolados.

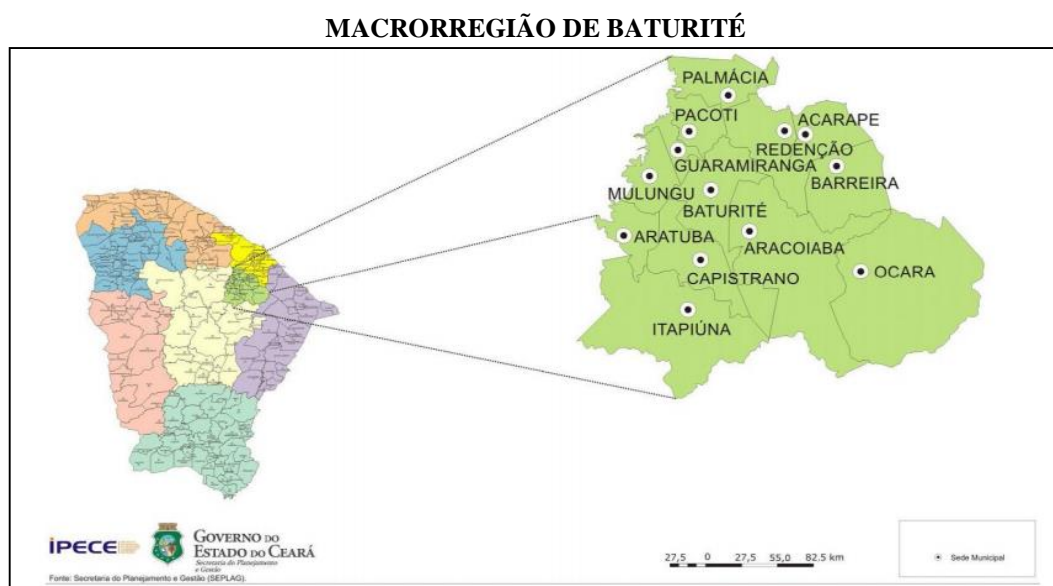
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de coleta

O trabalho foi realizado em uma área do maciço de Baturité que abriga um dos resquícios da Mata Atlântica no estado do Ceará (CAVALCANTE, 2005). Constitui, em parte, um enclave úmido em relação ao domínio morfoclimático das depressões intermontanas semiáridas cobertas por diferentes tipos de Caatinga.

A Serra de Baturité localiza-se na região do Maciço de Baturité, com coordenadas geográficas extremas entre 4°08' e 4°27' de latitude sul e 38°50' a 30°05' de longitude oeste (Figura 4), “representa um enclave úmido de floresta serrana no contexto semiárido do estado do Ceará (FRACALLOSSI JÚNIOR, 2000).

Figura 4: Organização da Macrorregião de Baturité



Fonte: IPECE/2007

Segundo Nascimento e colaboradores (2010), o enclave úmido da Serra de Baturité contempla integralmente as áreas dos municípios de Guaramiranga (59 km²), Pacoti (112 km²), Aratuba (143 km²) e Mulungu (135 km²). Abrange também parte dos Municípios de Baturité, Capistrano, Palmácia e Redenção.

4.2. Coleta e processamento das amostras

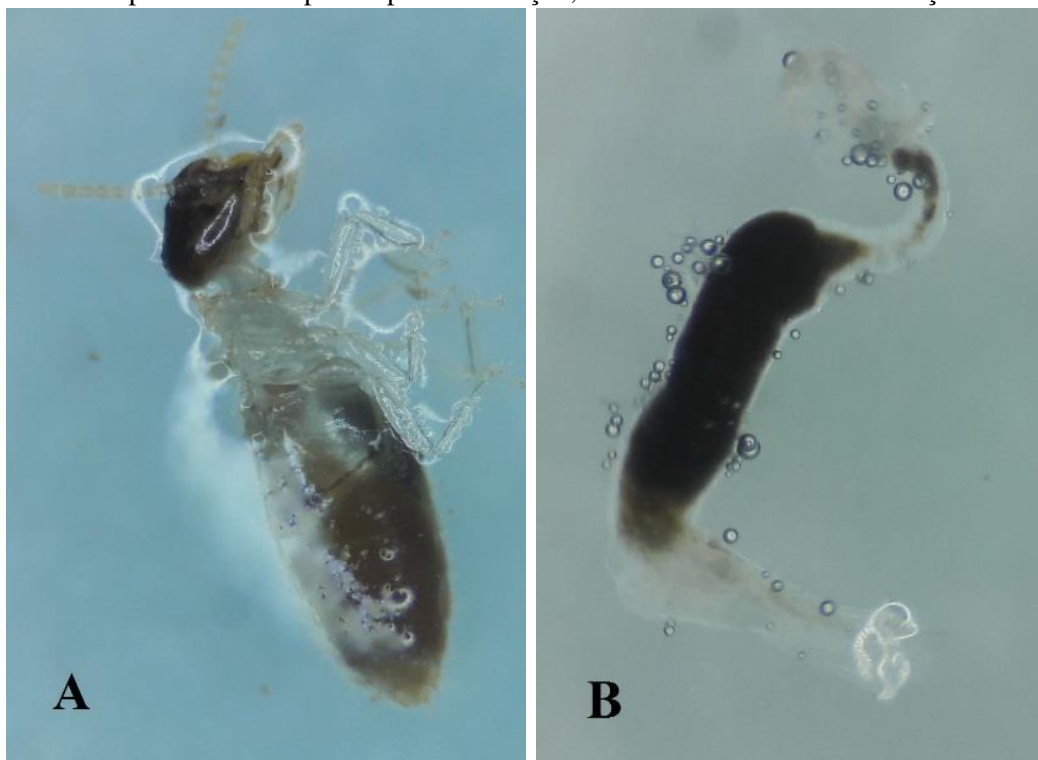
Colônias de isópteros foram manualmente coletadas durante o mês de fevereiro de 2019 (período chuvoso), durante o dia, na mata de Caatinga localizada atrás do Campus Auroras da UNILAB. Os pontos de coleta foram marcados com o uso do GPS (sistema de posicionamento global) do app Google Maps da empresa Google. Foram escolhidos dois pontos de coleta de acordo com a presença de ninhos epígeos e arbóreos, P1(4°13'03.9" S 38°42'55.3" W) e P2 (4°13'03.6" S 38°42'55.2" W). As amostras foram conduzidas ao laboratório em caixas organizadoras e feito a triagem dos indivíduos de restos de solo, folhas e madeira.

4.3. Isolamento e cultivo de bactérias associadas ao trato digestório de isópteros

Para o isolamento da bacteriofauna cultivável associada ao trato digestivo dos isópteros, 10 indivíduos foram desinfetados superficialmente por meio de imersão em solução desinfetante (0,5% de hipoclorito de sódio e etanol 70%) por 5 min em agitação magnética. Em seguida os espécimes foram submetidos a três banhos sucessivos em água

destilada estéril (5min/cada), em agitação magnética, para retirar o excesso de solução desinfetante. Os espécimes foram dissecados para a coleta do intestino (Figura 5). Utilizando uma seringa descartável para insulina com agulha, de 1 mL, foi feita uma incisão no abdome e sugado o conteúdo interno, o intestino foi separado do resto dos órgãos internos.

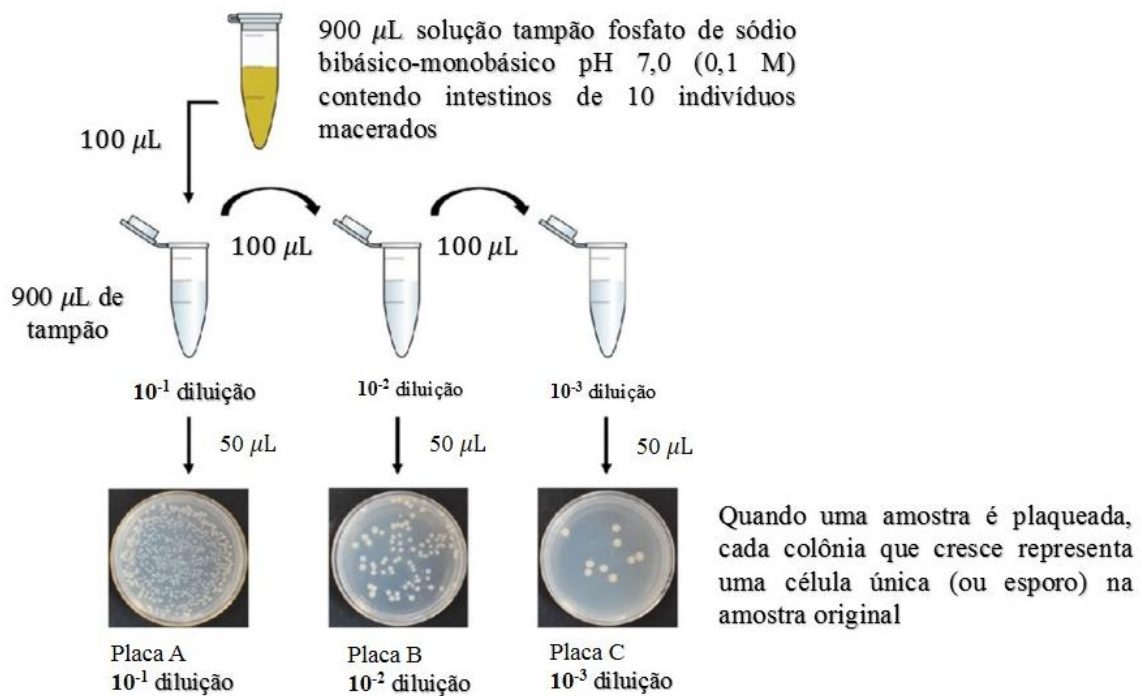
Figura 5: Espécimes em processo de dissecação para obtenção do intestino. **A:** inseto morto e desinfetado superficialmente pronto para dissecação; **B:** intestino obtido da dissecação do animal.



Fonte: Autor

Os intestinos de dez indivíduos da amostra estudada foram transferidos para um microtubo tipo eppendorf contendo 900 μL de solução tampão fosfato de sódio bibásico-monobásico pH 7 (0,1 M). O inóculo foi macerado e agitado por 1 min em agitador de tubos tipo *vórtex* e transferido um volume de 100 μL para outro microtubo contendo 900 μL da mesma solução tampão, diluindo seriadamente até concentração de 10^{-5} da concentração do extrato inicial conforme ilustrado abaixo.

Figura 6: Método de diluição seriada para obtenção de colônias isoladas.



Fonte: adaptado de Ayala (2017)

Em seguida, cada diluição foi agitada em vórtex e alíquotas de 50 µL foram plaqueadas pelo método do espalhamento em placa (*Spread plate*) em diferentes meios de cultura, sendo: 1) ágar nutriente (ATLAS, 2005); 2) Plate Count Ágar; 3) TSB (Acumedia®), e cultivadas a 28° C por 24h, ou até o surgimento de colônias.

As colônias foram inicialmente isoladas em placas contendo meio ágar nutriente de acordo com aspectos morfológicos (cor, formato, textura e tamanho). Posteriormente, cada cepa isolada foi cultivada em caldo nutriente, e preservada em 15% glicerol a temperatura de -80° C.

4.4. Caracterização morfológica dos isolados

Após a obtenção dos isolados endossimbiontes, foi realizada a análise das características coloniais por lupa estereoscópica (Fieldman Wild Leitz FWD-SMZ 7.5). Características como formato, cor, textura, e relevo foram observadas e utilizadas como parâmetros para diferenciar os isolados em morfotipos. A caracterização celular foi realizada por meio da técnica de coloração de Gram, seguindo protocolo descrito por Levy (2004) cuja finalidade é verificar as características estruturais da parede celular dos isolados bacterianos.

Por meio da coloração de Gram é possível classificar as células bacterianas em dois grandes grupos, as Gram positivas e Gram negativas. O teste envolve os seguintes processos: a) esfregação das bactérias em lâmina de vidro; b) coloração do esfregaço com solução corante Cristal Violeta por 1 min; c) lavagem em água destilada; d) adição de solução de Lugol por 1 min.; e) descoloração com solução de álcool absoluto e lavagem com água destilada corrente; f) coloração com o contra corante solução Safranina por 30 seg e g) lavagem em água destilada corrente.

Depois de secas, as lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), onde a morfologia, arranjos e a coloração da parede celular foram classificadas.

4.5. Pesquisa da produção de hidrolases em meio sólido

As bactérias isoladas foram testadas quanto à capacidade de produção das enzimas amilase, celulase, protease e lipase pela realização do método de difusão em Ágar. Para tanto, os inóculos de micro-organismo foram adicionados (1 μ L) em meios de culturas específicos para detecção de cada atividade enzimática e incubados a 28 °C. Os diâmetros dos halos de hidrólise ao redor das colônias foram medidos com paquímetro (mm). As atividades hidrolíticas foram estimadas através do cálculo do índice enzimático (IE), utilizando-se a seguinte equação: $IE = D_h/D_c$, sendo D_h o diâmetro em mm do halo de hidrólise e D_c o diâmetro em mm das colônias dos isolados (Stamford *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2015). A avaliação dos índices enzimáticos (I.E) considerou valores $\geq 1,0$ como indicativo de atividade enzimática em meio sólido (LEALEM; GASHE, 1994; STAMFORD; ARAÚJO, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Todos os testes foram realizados em triplicatas, e as médias foram analisadas pelo teste ANOVA, a 5% de probabilidade, por meio do programa PAST (Paleontological Statistic, version 2.1).

4.5.1. Amilase

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon *et al.* (1957). Os isolados foram suspensos em solução salina (NaCl 0,9%) e inoculados no meio ágar amido (0,5 g/L de NaCl, 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona caseína, 1 g/L de amido e 15 g/L de ágar) em triplicata. As culturas foram incubadas por 7 dias a 28°C. Para visualização do resultado foram adicionados de 10 ml de solução lugol (5 g/L de iodo, 10 g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da enzima foi detectada pela formação de uma zona amarela ao redor da colônia indicando degradação do amido.

4.5.2. *Protease*

Para detecção da atividade proteolítica foi utilizado o meio Ágar-leite (18g/l de ágar e 10g/l de leite em pó desnatado). A produção de proteases é observada nas placas de Ágar-leite sem a necessidade de um revelador, onde o resultado positivo é identificado pela formação de halos claros ao redor da colônia (SOUSA *et al.*, 2008).

4.5.3. *Celulase*

A atividade celulolítica dos isolados foi avaliada conforme metodologia descrita por WOOD *et al.*, (1982), utilizando-se de meio de cultura PCA (*Plate Count Ágar*) suplementado com de carboximetilcelulose (0,5%). Os isolados foram inoculados no meio de cultura e incubados por 10 dias a 28°C. Para detecção da atividade, foram adicionados 10 mL da solução de vermelho congo 0,5 % (m/v) em cada placa, deixando-se agir por 30 minutos. Em seguida, o excesso da solução foi descartado e adicionou-se 10 mL de solução de NaCl 1 M, deixando-se agir por 15 minutos sob temperatura ambiente. A produção da enzima celulase foi detectada através da descoloração alaranjada ao redor das colônias devido à reação da celulose com o vermelho congo.

4.5.4. *Lipase*

Para detecção de atividade lipolítica foi realizado o teste descrito GUPTA *et al.* (2004) utilizando meio de cultura Plate Count Ágar (23,5 g/l), de óleo de oliva (1%) e Tween 80 (0,1%). O meio foi inoculado e incubado a temperatura de 28° C durante 7 dias. A atividade positiva foi observada pela formação de um halo diferenciado ao redor da colônia, devido as substâncias adicionadas ao meio (GUPTA *et al.*, 2004; FREIRE, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e cultivo de bactérias associadas

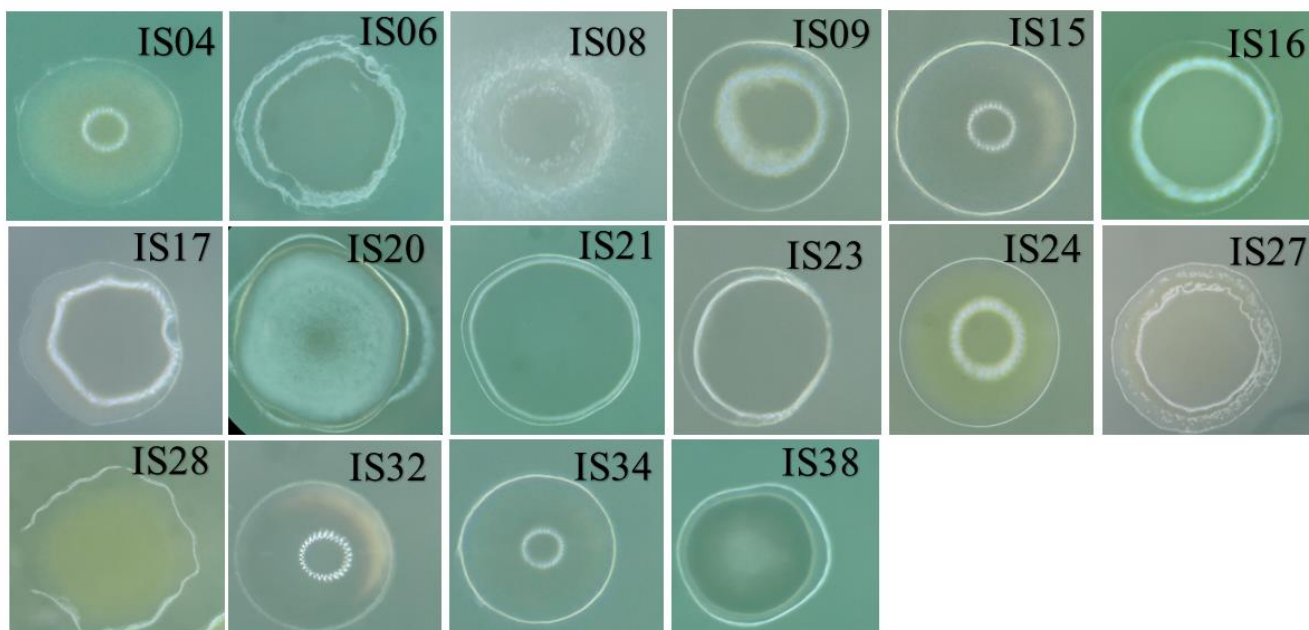
O cultivo das bactérias associadas ao trato digestivo de isópteros nos diversos meios de cultura utilizados, permitiu a detecção de uma microbiota morfológicamente diversificada (Figura 7 e 8). No total foram isolados 38 morfotipos de cepas bacterianas, no entanto, como é relativamente difícil simular em laboratório as condições nas quais esses micro-organismos estão adaptados em suas condições vitais, ao longo do estudo alguns isolados foram tornando-se inviáveis para o cultivo. Além disso, é bastante laborioso manter todas essas espécies em *in vitro* visto que as condições de cultivo são diferentes entre as diversas espécies isoladas.

Foi realizado um estudo morfológico das colônias, que muitas vezes, são úteis na sua identificação preliminar, mas em muitos casos, elas são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies (ANDRADE, 2008). Na tabela 1 estão apresentadas as características morfológicas observadas para os isolados. Houve um predomínio de bactérias de coloração clara, sendo a maioria esbranquiçada, e algumas de coloração amarela. Foram observadas colônias achatadas, elevadas e convexas; com bordas puntiforme, circular ou lisa e irregular. Em relação a umidade, 85% das colônias são úmidas e 15% são secas e apresentam aspecto opaco e translúcido. Nenhuma das colônias produz goma.

Tabela 1. Caracterização morfológica celular e colonial dos isolados

Isolados	Cor	Elevação	Borda	Opaca/ translúcida	Morfologia celular	Gram
<i>IS04</i>	Amarela	Convexa	Circular	Opaca	Bastonete	-
<i>IS05</i>	Branca	Achatada	Puntiforme	Opaca	Bastonete	+
<i>IS06</i>	Branca	Elevada	Irregular	Translúcida	Bastonete	+
<i>IS08</i>	Branca	Convexa	Irregular	Opaca	Filamentosa	+
<i>IS09</i>	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Bastonete	+
<i>IS15</i>	Branca	Convexa	Circular	Translúcida	Coco	+
<i>IS16</i>	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Coco	+
<i>IS17</i>	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Bastonete	+
<i>IS19</i>	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Bastonete	+
<i>IS20</i>	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Filamentosa	+
<i>IS21</i>	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Bastonete	+
<i>IS23</i>	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Bastonete	+
<i>IS24</i>	Amarela	Convexa	Circular	Opaca	Coco	+
<i>IS25</i>	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Bastonete	-
<i>IS27</i>	Branca	Elevada	Circular	Opaca	Bastonete	+
<i>IS28</i>	Amarela	Achatata	Irregular	Translúcida	Bastonete	+
<i>IS32</i>	Branca	Convexa	Circular	Translúcida	Cocobacilo	+
<i>IS34</i>	Branca	Convexa	Circular	Translúcida	Coco	+
<i>IS37</i>	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Bastonete	+
<i>IS38</i>	Branca	Convexa	Circular	Opaca	Filamentosa	+

Figura 7: Caracterização morfológica das colônias isoladas do trato digestório de cupins.

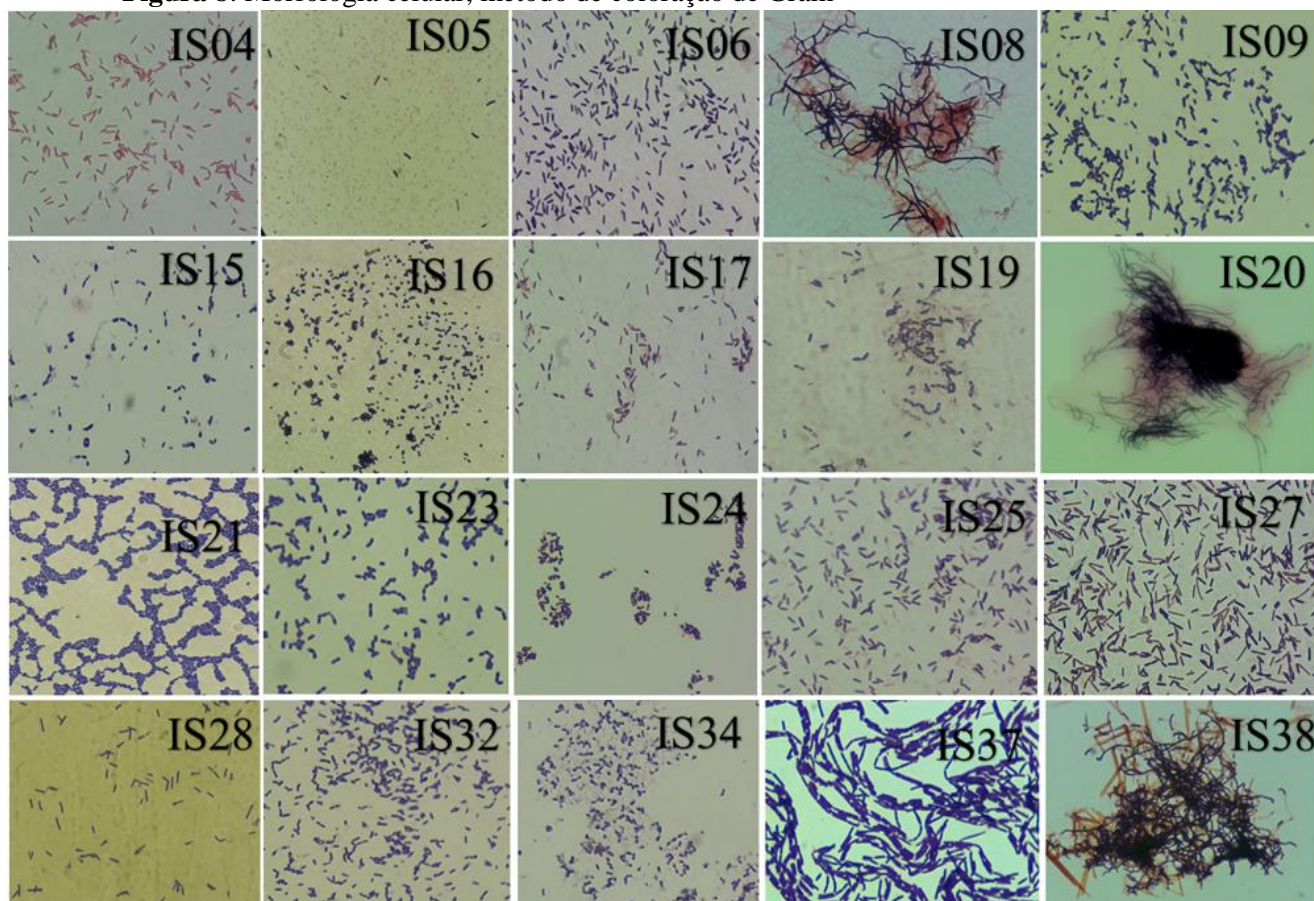


Fonte: Autor

A análise morfológica celular revelou que dentre os isolados 20% (4) apresentaram morfologia de cocos, sendo encontrados os arranjos estreptococos, estafilococos, cocobacilos e diplococos; 65% (13) com morfologia bacilar, sendo encontrados os arranjos de estreptobacilos e 15% (3) dos isolados apresentaram uma morfologia celular filamentosa (Figura 8).

A coloração de Gram revelou que 95% (18) dos isolados foram gram-positivos e 10% (2) gram-negativos. Estudos sobre a microbiota intestinal de insetos flebotomíneos revelaram uma prevalência de bactérias gram-negativas pertencentes ao grupo dos não fermentadores de açúcar (OLIVEIRA et al, 2000).

Figura 8: Morfologia celular, método de coloração de Gram



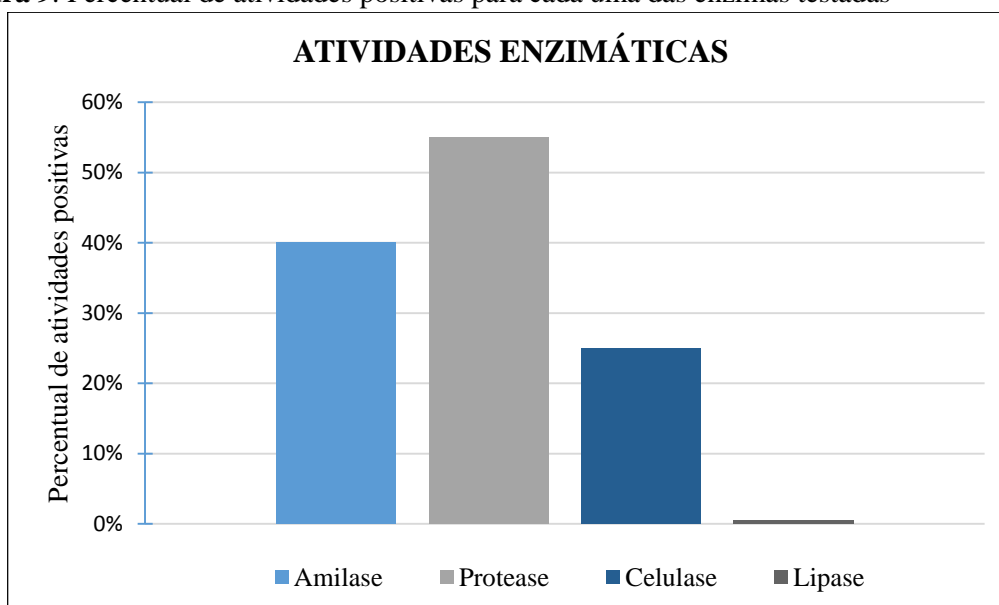
Fonte: Autor

5.2 Produção de hidrolases por bactérias associadas ao trato digestório de cupins

Os resultados da detecção de diferentes enzimas pelos isolados podem ser observados na tabela 2 e figuras 9, 10 e 11. Foi detectada a produção das enzimas amilase, protease e celulase, no entanto nas condições determinadas nenhum micro-organismo foi capaz de formar halo determinando a produção de lipase. A figura 9 apresenta o percentual de atividades positivas para cada uma das enzimas testadas. A protease se destaca por apresentar o maior percentual 55% (11) de isolados positivos, além de apresentar o maior índice enzimático de 4,64 conforme a tabela 2. Dentre os isolados destaca-se IS19 que apresentou três das quatro atividades testadas, 35% dos isolados foram positivos para duas atividades enzimáticas, 30% foram positivos para pelo menos uma das atividades testadas, e 30% não apresentaram nenhuma das atividades enzimáticas testadas. Os cupins consomem madeira morta sã em vários estágios de decomposição. Segundo Martin (1979) este comportamento apresenta vantagens pois os alimentos em

decomposição apresentam uma pré-digestão, o que pode explicar a ausência de bactérias capazes de degradar lipídeos e gorduras neste estudo.

Figura 9: Percentual de atividades positivas para cada uma das enzimas testadas



Fonte: autor

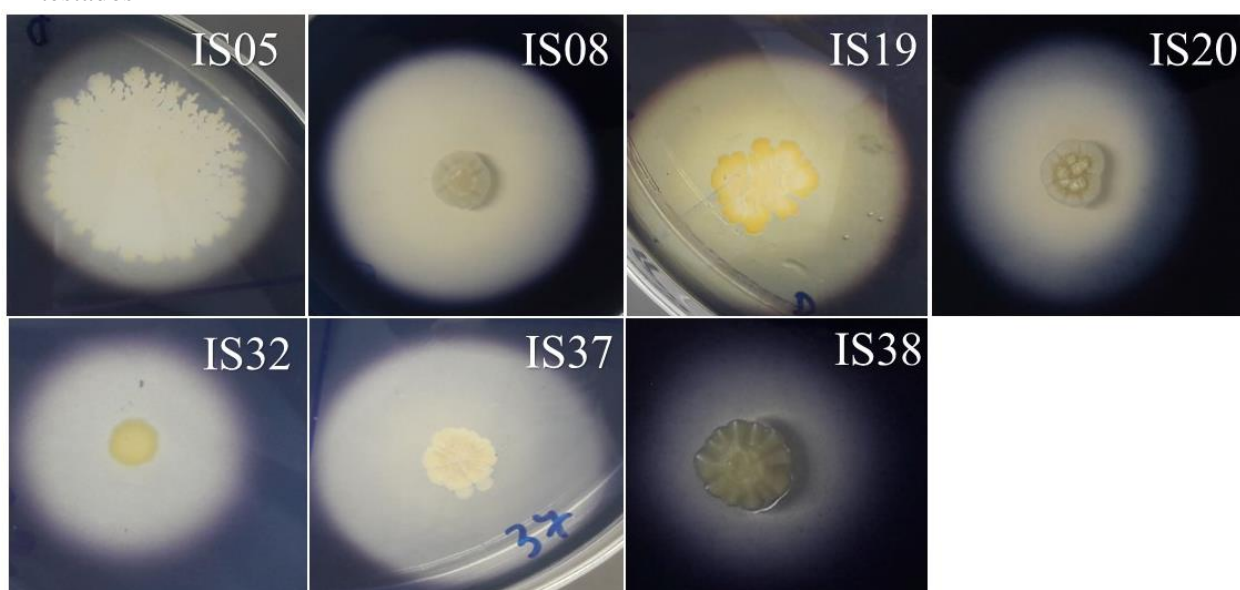
Tabela 2. Atividades enzimáticas apresentadas pelos isolados bacterianos obtidos a partir do trato digestivo de isópteros e média do índice enzimático (IE) das enzimas produzidas pelos isolados, calculado após 7 dias de incubação.

Isolados	Amilase/IE	Protease/IE	Celulase/IE	Lipase/IE
IS04	-	-	-	-
IS05	+1,41	+2,53	-	-
IS06	-	+2,25	-	-
IS08	+4,05	+3,23	-	-
IS09	-	-	-	-
IS15	-	-	-	-
IS16	-	-	-	-
IS17	-	+3,0	+2,39	-
IS19	+3,36	+2,29	+2,38	-
IS20	+3,31	+4,0	-	-
IS21	-	-	-	-
IS23	-	-	-	-
IS24	+2,7	-	-	-
IS25	-	+2,37	-	-
IS27	-	+2,32	+2,89	-
IS28	-	+2,02	-	-
IS31	-	-	-	-
IS32	+3,9	-	-	-
IS34	-	-	+1,16	-
IS37	+3,58	+4,64	+2,51	-
IS38	+2,45	+2,78	-	-

* IE = Índice de atividade enzimática - é a razão entre o diâmetro do halo de atividade enzimática (mm) e o diâmetro da colônia (mm) medidos após 7 dias de cultivo.

Somente oito isolados foram capazes de degradar o amido, o isolado IS08 apresentou o índice enzimático igual 4,05, o maior encontrado. A análise de variância dos dados demonstrou um valor de p igual a 0,00067 ($p < 0,05$) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de amilases. As amilases têm uma gama imensa de aplicações industriais, tais como fabricação de ração animal, indústria de papel, indústria têxtil, indústria de alimentos e energia renovável (SUN *et al.*, 2010).

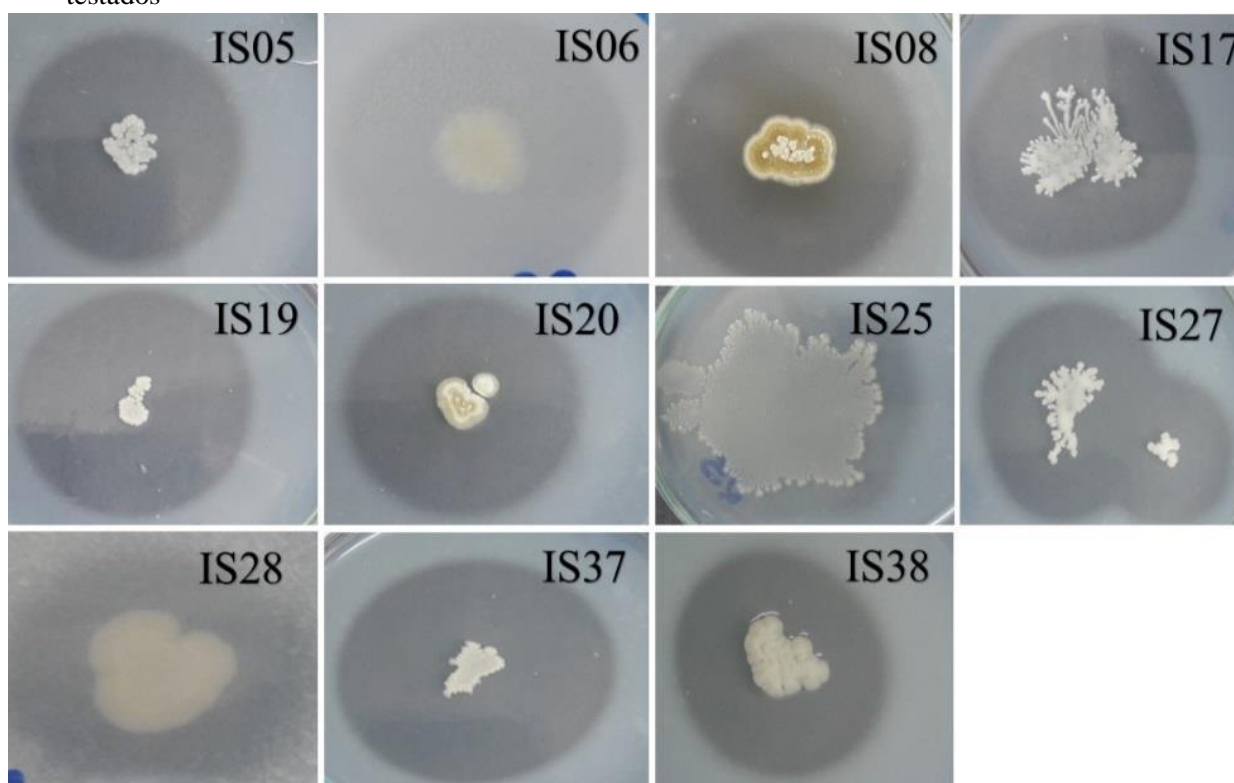
Figura 10: Halo indicativo da produção de amilase em meio sólido apresentado pelos isolados testados



Fonte: Autor

A protease foi encontrada em onze dos isolados, o maior índice enzimático encontrado foi igual a 4,64 no isolado IS37. A análise de variância dos dados demonstrou um valor de p igual a 0,01182 ($p < 0,05$) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de proteases. As proteases são utilizadas na indústria farmacêutica para a preparação de medicamentos, como pomadas para o tratamento de feridas (BHOSALES *et al.*, 1995).

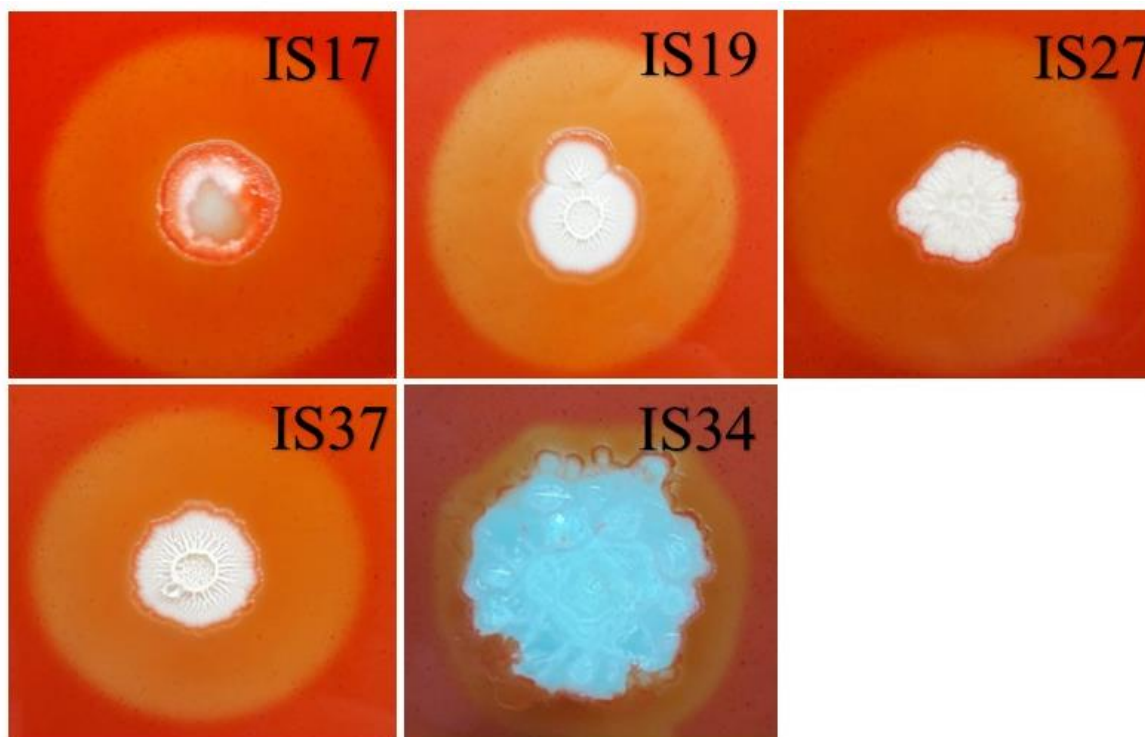
Figura 11: Halo indicativo da produção de protease (Caseinase) apresentado pelos isolados testados



Fonte: Autor

A atividade celulolítica foi detectada em cinco dos vinte isolados, sendo 2,89 o maior valor de I.E, encontrado em IS27. A análise de variância demonstrou um valor de p igual a 0,00000640 ($p < 0,05$) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de celulase. As celulases foram as que apresentaram o menor percentual de isolados positivos. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que micro-organismos em cultura pura regularmente demonstram atividades lignocelulosicas insatisfatórias (KIM *et al.*, 2006). A hidrólise enzimática da matéria-prima celulósica tem várias vantagens sobre os processos químicos, devido à sua potencial eficiência de sacarificação, bem como menor consumo de energia (SARATALE *et al.*, 2008; SARATALE *et al.*, 2010).

Figura 12: Halo indicativo da produção de celulase apresentado pelos isolados testados



Fonte: Autor

A produção de lipase não foi observada em nenhum dos isolados. As lipases são enzimas que têm aplicações importantes na área de biotecnologia, especialmente na produção de bioenergia, onde o setor encontra-se em expansão, resultado do aumento da demanda mundial de energia renovável (COLLA *et al.*, 2010).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os micro-organismos estudados mostraram uma diversidade morfológica celular e colônial e os testes enzimas revelaram algumas cepas capazes de degradar celulose, amido e proteínas, em meios sólidos e de baixo custo, o que os confere um potencial de aplicação em diversos bioprocessos industriais e biotecnológicos, uma vez que tem se buscado otimização da produção dessas enzimas no sentido de baratear os custos de produção dos produtos finais gerados partir desses bioprocessos. No entanto, mais estudos são necessários sobre as características físico-químicas e bioquímicas dessas enzimas, como também a identificação molecular dos isolados por meio do sequenciamento do RNA ribossomal 16S. A identificação das espécies de isópteros utilizados neste estudo será realizada futuramente afim de trazer informações mais profundas acerca da diversidade bacteriana associada ao trato digestório destes animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D.M. Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

ARANTES, V.; SADLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. 2010 Article in press. doi:10.1186/1754-6834-3-4.

BELOQUI, A.; DE MARIA, P. D.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Recent trends in industrial microbiology. *Current Opinion Microbiology*, v. 11, p. 240-248, 2008.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de ruminantes. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355–383, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BURKE, J.D. et al. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, v.43, n. 4, p. 795-803, 2011./

CAMPBELL, B.C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.). *Insect Plant Interactions*

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**, Disponível: <http://www.redetec.org.br/publique/media/mct_recursos_biologicos.pdf>, 2003. Acesso em 12 de julho de 2019.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; SANDOVAL, G.; MARTY, A. **Lipases: an overview**. In: SANDOVAL, G. (ed.) *Lipases and phospholipases: methods and protocols*. México, Humana Press., p. 3-30, 2012.

CASTRO, A.M.; PEREIRA, J.R.N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 181-188, jan. 2010.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L.. Directed Evolution of Industrial Enzymes: an Update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

COLLA, L. M; RIZZARDI, J; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O; BERTOLIN, T. E; VIEIRA COSTA, J. A. Simultaneous Production of Lipases and Biosurfactants by Submerged and Solid-state Bioprocesses. **Bioresource Technology**, Rio Grande do Sul, v.101, n.21, p.8308–14, 2010.

COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. Manual of microbiological methods. New York: McGraw-Hall, 1957. p. 239-262.

DELABONA, P. S. Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2011.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**. 49:71-92, 2004. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. p.760

FELDHAAR, E. Bacterial symbiontes as mediators of ecologically important traits of insects hosts. **Ecological Entomology**, London, v.36, p533-543, 2011.

FORESTI M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 2006.

FREIRE, D.M. G. Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA – NETO, S.; CARVALHO, R. P. L. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

- GHANEM, E.H.; AL-SAYED, A.; SALEH, K.M. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.16, p. 459-464, 2000
- GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. **J. Biotechnol.**, v. 96 (1), p. 35-42, 2002.
- GRACE, J.K; YATES,J.R. 1992. Behavioural effects of a nim insecticide on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Trop. Pest. Manag**, 38 (2): 176-180.
- GRAEFF, A.A.; *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1-18, 2003.
- GUPTA, R.; GUPTA, N. and RATHI, P. – Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, V.64, 763-781, 2004
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p. 597-607, 1979.
- HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. **Amilase Fungica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.
- HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, p. 358-364, 1999.
- IPECE. **A regionalização do Estado do Ceará**. Fortaleza: IPECE, 2007
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Op. Biotechnol.**, v. 13, p. 390-397, 2002.

KALTENPOTH, M., ENGL, T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1265-2435.12089/pdf>>. Acesso em: 23 jun 2019.

KAUFMAN, M.G. & KLUG, M.J. The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera, Gryllidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 98A:117-123, 1991.

KHEMAKHEM, B. et al. Purification and characterization of a maltogenic amylase from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds using the Box Benkhen Design (BBD). **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 334–339, 2013.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1547, p. 262-267, 2001.

LÄMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 575–592, 2007.

LEVY, C. E. **Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica**. In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Editora Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), módulo 3, 45 p., 2004.

Li X-h, Yang H-j, Roy B, et al. The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization. *Afr J Biotechnol* 2009 8. .

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 572–577, 2002.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome – a challenging source of enzyme discovery. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 13-19, 2002.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome – a challenging source of enzyme discovery. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 13-19, 2002.

Lynd LR, Laser MS, Bransby D, et al. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 169-172.

Microbiologia de Brock [recurso eletrônico] / Michael T. Madigan ... [et al.] ; [tradução : Alice Freitas Versiani ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca]. – 14. ed.– Porto Alegre : Artmed, 2016.

MORAN, N.A. Symbiosis. **Current Microbiology**, New York, v.16, n.20, p.R866-R871, 2006.

MORAN, N.A.; BAUMANN, P. Bacterial endosymbionts in animals. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, p.270-275, 2000.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NANDY, S. K. Bioprocess Technology Governs Enzyme Use and Production in Industrial Biotechnology: An Overview. **Enzyme Engineering**, v. 5, n. 1, 2016

Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, A. (2002) Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:345-352.

Nos insetos em geral é comum a ocorrência de uma microbiota no trato digestivo, que auxilia no processo de digestão, além de desempenhar muitas outras funções (DILLON & DILLON, 2004) DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**. 49:71-92, 2004.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T.; LEPAGE, E. S. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Coord.). **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, I: 99-278, 1976.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação Prospecção de Recursos Microbianos. 2007. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf>. Acessado em: 12 de julho de 2019.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1a

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, V. 25, p. 45-61. 2002.

R. Kolakovic, Nanofibrillar cellulose in drug delivery, 2013.

RAO, M.B. et al. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v.62, n.3, p.597-635, 1998

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; ET AL. Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; ET AL. Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the

Saha BC. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* 2000; 18: 403-423.

SANTO-DOMINGO, J.W.; KAUFMAN, M.G.; KLUG, M.J.; HOLBEN, W.E.; HARIS, D.; TIEDJE, J.M. Influence on diet on the structure and function os the bacterial hindgut community of crickets. **Molecular Ecology**. 7:761-767, 1998.

SANTOS, F.A, Iulianelli GC, Tavares MIB, The Use of Cellulose Nanofillers in Obtaining Polymer Nanocomposites: Properties, Processing, and Applications, *Materials Sciences and Applications* 2016; 7: 257.

SARATALE, G.D.; CHEN, S.D.; LO, Y.C.; SARATALE, R.G.; CHANG, J.S. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation e a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.962-979, 2008

SARATALE, G.D.; SARATALE, R.G.; LO, Y-C.; CHANG, J.S. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and their applications for cellulosic biohydrogen production. **Biotechnology Progress**, v.26, p.406-416, 2010.

SARROUH, B.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal Bioprocessing & Biotechnique**, S4:002, 2012.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methodology**, v. 52, p.1-18, 2003.

SERBUS, L.R.; CASPER-LINDEY, C.; LANDMAN, F.; SULLIVAN, W. The genetics and cell biology of Wolbachia-host interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.42, p.683-707, 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. Research review paper. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIOZIOS, S.; SAPOUNTZIS, P.; IOANNIDIS, P.; BOURTZIS, K. Wolbachia symbiosis and insect immune response. *Insect Science*, v. 15, p.89-100, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7917.2008.00189.x/pdf>. Acesso em: 04 mai 2019

SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONCA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONCA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

SUN, H; ZHAO, P; GE, X. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, China, v. 160, p. 988–1003, 2010.

TAKAMINE, J. Enzymes of *Aspergillus Oryzae* and the Application of Its Amyloclastic Enzyme to the Fermentation Industry. **Journal of Industrial & Engineering Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 824–828, out. 1914.

TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**. 35:181-200. 1990

UYAR, F.; BAYSAL, Z. (2004), Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p.1893- 1898.

VAN BEILEN, J.; LI, Z. Enzyme Technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

VIEITES, J. M.; GUAZZARONI, M. E.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Metagenomics approaches in systems microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 33, p. 236-255, 2009.

VIEITES, J. M.; GUAZZARONI, M. E.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Metagenomics approaches in systems microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 33, p. 236-255, 2009.

WALLER, D.A. & LA FAGE, J.P. 1986. Nutritional ecology of termites. In *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates* (F. Slansky Jr. & J.G. Rodriguez, eds.). John Wiley & Sons, New York, p.487-532.

WIGGLESWORTH, V.B. Digestion in the tsetse-fly: a study of structure and function. **Parasitology** 21:288-291, 1929

WOOD, T. M. Properties and mode of action of cellulases. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 5, p. 111-137,1975.

ZHANG Y-H.P; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p. 797-824, 2004.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.;

ZOOK, D. A new symbiosis language. **Symbiosis News**, Plymouth v.1, n.3, p.1-3, 1998