UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A UTILIZAÇÃO NA SÍNTESE DE BIOETANOL

Glaci Venturini Moro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profª. Drª Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 18 de maio de 2015

Essa dissertação é dedicada
às pessoas mais importantes da minha vida: minha família

À minha irmã Angélica e ao meu cunhado Diogo
pelo indispensável apoio, companheirismo, exemplo
e carinho em todos os momentos, bons ou ruins.
Vocês fizeram e fazem toda a diferença.

Aos meus pais, Adelino e Matilde.
Aos meus irmãos Darlene e Alcione.
À cunhada Ediana.
Às minhas sobrinhas lindas.
Ao meu amor Rodrigo.
O amor, a compreensão e o incentivo de vocês
foram fundamentais durante minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Drª Marilene Henning Vainstein, pela grande oportunidade a mim concedida de fazer parte de sua equipe de laboratório. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, apoio e carinho.

À Roberta Bussamara Rodrigues pela amizade, confiança e oportunidade de trabalho, a qual foi essencial para meu ingresso no mestrado.

Às queridas Mariana e Caroline pelo companheirismo, dedicação, comprometimento e amizade durante este período.

Aos professores Lívia Kmetzsch e Charley C. Staats pela amizade, apoio, exemplo e disposição em ajudar.

A todos os colegas e amigos dos laboratórios 220 e 217 pela amizade, risadas, ajudas e incentivo, em especial à Letícia, Sara, Francine, Rafael, Ângela e Vanessa.

À Franciele Maboni pela disponibilidade, atenção e sugestões na revisão desse trabalho;

Aos professores, Alexandre Macedo e Diogo Lüdtke, membros da comissão de acompanhamento;

Aos secretários do PPGBCM, principalmente Luciano e Silvia, pela disponibilidade e auxílio no decorrer do mestrado;

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização de um Ensino Superior de qualidade;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS vi
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABELAS ix
RESUMO 01
ABSTRACT 02
1. INTRODUÇÃO 03
2. REVISÃO DE LITERATURA 06
2.1. Biomassa lignocelulósica 06
2.1.1. Celulose 07
2.1.2. Hemicelulose 08
2.1.3. Lignina 10
2.2. Produção de etanol a partir do material lignocelulósico 12
2.2.1. Pré-tratamento 13
2.2.2. Hidrólise 16
2.2.2.1. Celulases 17
2.2.2.2. Hemicelulases 20
2.2.3. Fermentação 22
2.3. Micro-organismos silvestres brasileiros 27
3. OBJETIVOS 28
3.1. Objetivo Geral 28
3.2. Objetivos Específicos 28
4. MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1. Micro-organismos utilizados 29
4.2. Meio para Manutenção Celular 34
4.3. Triagem dos micro-organismos produtores de celulases em meio sólido 34
4.4. Atividade celulolítica em meios líquidos 36
4.5. Determinações quantitativas 37
4.5.1. Atividade CMCase 37
4.5.2. Atividade de celobiase 37
4.5.3. Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase) 38

4.6. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford 38
4.7. Triagem de micro-organismos produtores de xilanases em meio sólido 39
4.8. Ensaios para seleção de micro-organismos fermentadores de xilose 40
4.8.1. Padronização do inóculo 40
4.8.2 Avaliação da capacidade de assimilação de xilose 41
4.8.3. Teste para seleção de micro-organismos com potencial para produção de etanol 42
4.8.4. Quantificação de etanol produzido e xilose consumida 42
4.9. Identificação Molecular 42
4.9.1. Extração do DNA genômico 42
4.9.2. Amplificação de DNA ribossomal e seqüenciamento 43
4.10. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
5.1. Celulases 47
5.1.1. Atividade celulolítica em meio sólido 47
5.1.2. Atividade enzimática em meio líquido 49
5.1.3. Determinação das proteínas totais 54
5.1.4. Determinação da atividade específica das CMCases 56
5.2. Xilanases 58
5.2.1. Triagem de leveduras produtoras de xilanases em meio sólido 58
5.3. Fermentação da Xilose 59
5.3.1. Avaliação da capacidade de assimilação de xilose 59
5.3.2. Quantificação de etanol na fermentação da xilose 60
5.4. Identificação molecular dos micro-organismos selecionados 63
5.5. Caracterização de componentes protéicos por SDS-PAGE 64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES 67
7. PERSPECTIVAS 69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70
9. ANEXOS 79

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amônio
Bis	Bis-acrilamina
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GYMP	Glicose, extrato de levedura e peptona
HMF	Hidroximetilfurfural
IEA	Índice Enzimático de Atividade
DO	Densidade ótica
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
YEPD	Extrato de levedura peptona dextrose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do carbono ……... **04**
Figura 2: Constituintes da biomassa lignocelulósica **07**
Figura 3: Estrutura tridimensional da celulose **08**
Figura 4: Constituintes da hemicelulose **09**
Figura 5: Estrutura da xilana **10**
Figura 6: Precursores monoméricos da lignina e estrutura da lignina **11**
Figura 7: Principais etapas na produção de etanol a partir de material lignocelulósico **13**
Figura 8: Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico **14**
Figura 9: Esquema representativo da ação do complexo de celulases **18**
Figura 10: Estrutura da xilana e xilobiose e enzimas responsáveis pela sua degradação **21**
Figura 11: Fermentação etanólica **23**
Figura 12: Estrutura do corante vermelho do Congo **47**
Figura 13: Avaliação qualitativa da atividade de CMCase através da formação dos halos descoloridos ao redor da colônia dos micro-organismos após coloração com o vermelho de Congo **48**
Figura 14: Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS **50**
Figura 15: Avaliação da atividade de CMCase em leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* **51**
Figura 16: Avaliação da atividade de CMCase para os isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* . **52**
Figura 17: Avaliação da atividade de celobiase para o isolado de solo de alambique TE13 em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* **53**
Figura 18: Estrutura do corante “Comassie Brilhant Blue” BG-250 ..... **55**
Figura 19: Avaliação da dosagem de proteínas totais de isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* . **55**
Figura 20: Avaliação da dosagem de proteínas totais para as leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* **56**

Figura 21: Avaliação da atividade específica de CMCase para leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* **57**
Figura 22: Avaliação da atividade específica de CMCase para os isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei* **58**
Figura 23: Análise das proteínas totais secretadas do sobrenadante dos cultivos utilizados para precipitação das proteínas com TCA por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) **65**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das leveduras testadas durante o processo de avaliação do potencial lignocelulósico **30**

Tabela 2: Relação de isolados de solo de alambique testados durante o processo de avaliação do potencial lignocelulósico **33**

Tabela 3: Composição do meio de triagem em placas de Petri **34**

Tabela 4: Composição do meio líquido para produção enzimática **36**

Tabela 5: Composição do meio sólido para triagem em placas de Petri **39**

Tabela 6: Composição do meio basal para assimilação de xilose **41**

Tabela 7: Gel concentrador **45**

Tabela 8: Gel separador **45**

Tabela 9: Tampão de corrida e tampão de amostra **46**

Tabela 10: Médias dos índices enzimáticos de atividade (IEA) das CMCases dos micro-organismos cultivados em meio sólido **49**

Tabela 11: Resultados de atividade enzimática de CMCase (U/mL) obtidos nos testes em meio líquido utilizando leveduras **79**

Tabela 12: Micro-organismos isolados de solo de alambique selecionados como bons produtores de CMCase (U/mL) em meios agitados **79**

Tabela 13: Micro-organismos selecionados por apresentarem crescimento em meio contendo xilose, com DO superior a 4 ou crescimento filamentoso **59**

Tabela 14: Micro-organismos submetidos a fermentação para produção de etanol **61**

Tabela 15: Concentração de etanol produzido e xilose consumida após 96 h **62**

Tabela 16: Identificação molecular dos micro-organismos selecionados como potenciais produtores de celulases **64**

RESUMO

As mudanças climáticas, aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia, têm motivado uma corrida sem precedentes à produção de combustíveis alternativos, preferencialmente de fontes renováveis. Em vista disso, o presente trabalho visou avaliar a biodiversidade e realizar a bioprospecção de micro-organismos provenientes de diversos ambientes florestais brasileiros e selecionar micro-organismos capazes de produção de enzimas do complexo celulolítico e sua capacidade para a produção de bioetanol. Duzentos e trinta e sete micro-organismos silvestres foram utilizados para os testes de atividade enzimática, quatro linhagens de leveduras e 10 isolados de solo de alambique apresentaram notável índice enzimático de atividade (IAE) em meio sólido. Dentre os isolados pré-selecionados, as leveduras apresentaram menor atividade celulásica em meio líquido, enquanto que dos isolados de solo de alambique, destacaram-se TE13 e T8a, por apresentarem maior atividade hidrolítica em cultivo líquido, contendo carboximetilcelulose. O TE13 foi o único micro-organismo a apresentar atividade na degradação da celobiose. No entanto, nenhum micro-organismo testado apresentou atividade FPase. A identificação molecular desses micro-organismos revelou que o isolado TE13 é pertencente ao gênero *Aspergillus*, enquanto que T8a foi identificado como pertencente ao gênero *Penicillium.* No estudo para avaliar a capacidade de produção de xilanases, nenhum dos micro-organismos testados mostrou resultados satisfatórios. Setenta micro-organismos foram selecionados por sua capacidade de assimilação da xilose, porém, apenas três mostraram capacidade de produção de etanol em níveis moderados.

ABSTRACT

Climate changes and the growing demand for energy have motivated an unprecedent number of studies for the production of fuels, particularly those from biorenewable sources. The work described herein is focused in the evaluation of biodiversity and bioprospection of Brazilian microorganisms able to produce cellulolytic enzymes and for the production of bioethanol. Two hundred thirty seven wild microorganisms were used for enzymatic studies, and four yeasts and 10 *alambique* soil isolates have shown significant levels of enzymatic activity in solid medium. Among the pre-selected strains, yeasts have shown lower levels of cellulosic activity in liquid medium, while the TE13 and T8a *alambique* soil isolates have shown good hydrolytic activity in liquid medium containing carboxymethylcellulose. TE13 was the only microorganism to present cellobiase activity. However, none of the microorganisms tested have displayed FPase activity. Molecular characterization of the microorganisms revealed that TE13 belongs to *Aspergillus* sp., while T8a was identified as *Penicillium* sp. In the xylanase activity studies, we were not able to achieve significant results with any of the microorganisms evaluated. Seventy microorganisms were selected by their ability to assimilate xylose, however, only three of them were able to produce ethanol in moderate levels.

1. INTRODUÇÃO

Há milhões de anos atrás, o carbono atmosférico foi absorvido pelas plantas através da fotossíntese, e ao longo do tempo foi transformado no petróleo bruto e carvão. No entanto, desde a revolução industrial, muito se tem usado destas fontes de energia, fazendo com que esse excesso de carbono seja liberado de volta para a atmosfera. Assim, ao longo dos últimos anos, os níveis atmosféricos de CO_2 aumentaram consideravelmente. Acredita-se que esse aumento de CO_2 seja responsável pelas mudanças climáticas globais (Dashtban *et al.*, 2009).

As mudanças climáticas aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia têm motivado uma corrida sem precedentes à produção de combustíveis alternativos, preferencialmente de fontes renováveis. O uso de recursos energéticos renováveis pode ser parte da solução para as necessidades energéticas do mundo, de uma maneira ambientalmente sustentável (Stöcker, 2008). Alguns países optaram pelo uso de biocombustíveis por serem provenientes da biomassa, tais como o etanol produzido pela fermentação de açúcares extraídos de diversas culturas alimentares, tais como a cana-de-açúcar, o milho e a beterraba. O bioetanol produzido pela fermentação desses substratos é chamado de etanol de primeira geração.

O bioetanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis, que contribui para a redução dos impactos ambientais gerados pela utilização dos combustíveis fósseis. A queima de combustíveis fósseis aumenta os níveis de CO_2 na atmosfera, devido à utilização de fontes de carbono que não estão em circulação no meio ambiente. Por outro lado, o bioetanol não altera o ciclo do carbono, já que não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, uma vez que o CO_2 liberado durante o uso da biomassa é absorvido novamente no processo de fotossíntese para a sua formação (Stöcker, 2008) (Figura 1).

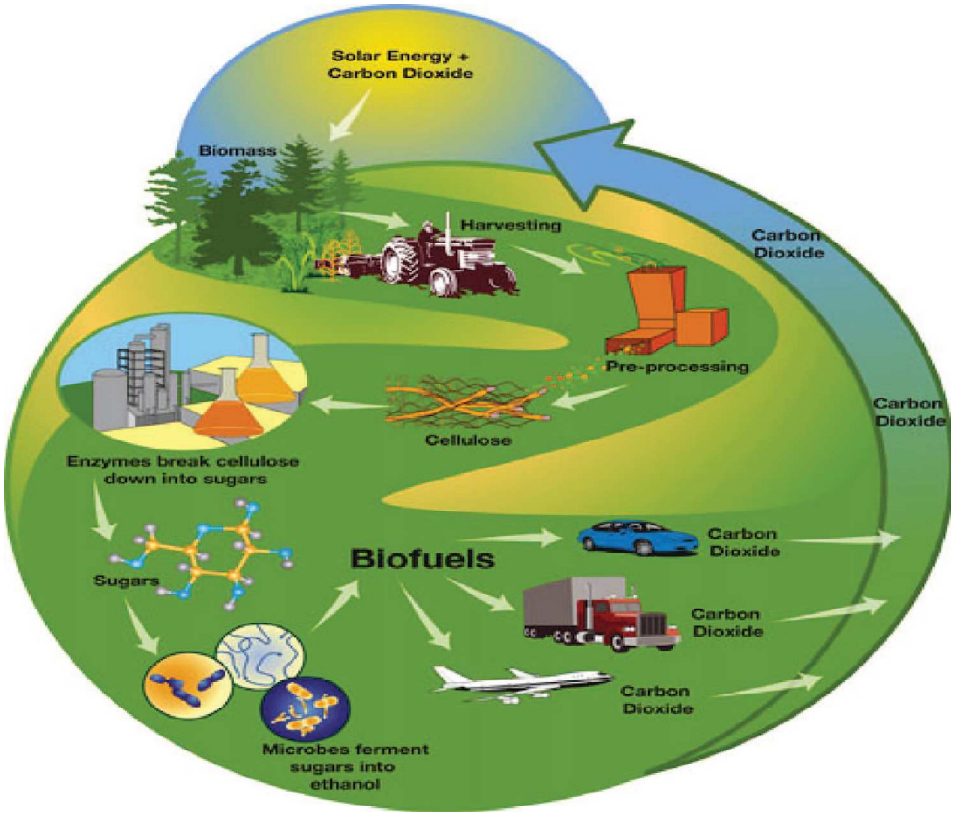

Figura 1: Ciclo do carbono. Fonte: Stöcker, 2008.

No entanto, uma das desvantagens apresentadas pelo bioetanol de primeira geração é que a fonte primária dos açúcares fermentáveis é uma cultura alimentar. Considerando-se que o constante crescimento da população mundial resulta em uma necessidade cada vez maior de produção de alimentos, a utilização de culturas alimentares como matéria-prima para a produção de combustíveis é uma desvantagem.

Outro substrato que pode ser utilizado para a produção de etanol é o material lignocelulósico, que por hidrólise leva a geração de glicose e outros açúcares, que podem ser fermentados à etanol. O bioetanol produzido a partir de material lignocelulósico é chamado de etanol de segunda geração (Ogeda e Petri, 2010). As matérias-primas de origem lignocelulósica, contêm de 30 a 60 % de celulose, 20 a 40 % de hemicelulose e 10 a 20 % de lignina. A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas, pela ação de enzimas, dando origem a glicose e outros açúcares. Estes, por sua vez, podem ser utilizados para a obtenção de uma gama de produtos, que

abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. A principal vantagem da utilização desse tipo de material como matéria-prima para a produção de etanol é que, em tese, quaisquer resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, serragem e resíduos da indústria madeireira podem servir como fonte primária de açúcares fermentáveis.

No entanto, devido à complexidade do material lignocelulósico, para sua hidrólise e fermentação é necessária a ação de um conjunto de enzimas. Um fator limitante para a ampliação da tecnologia de produção do bioetanol é a baixa eficiência e o alto custo das enzimas necessárias para degradação da biomassa lignocelulósica, portanto, a busca por novas fontes de enzimas capazes de contribuir para este processo é de grande interesse industrial. Neste contexto, atenção particular deve ser dada à microbiota silvestre existente no território brasileiro, visando seu melhor aproveitamento, já que o conhecimento da microbiota, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes micro-organismos, tornando-se importantes para as interações ambientais e em futuras aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas capazes de degradar materiais lignocelulósicos (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004; Peixoto, 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o principal recurso renovável disponível no ambiente e capaz de substituir materiais fósseis. É a matéria seca que constitui a maior parte do material vegetal das plantas lenhosas e não lenhosas. Existe uma grande variedade de fontes de material lignocelulósico: gramíneas, madeiras, subprodutos de colheitas, resíduos agrícolas, florestais e da indústria de papel. As grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos gerados através de práticas agrícolas e florestais, indústrias de celulose, madeira e outras agroindústrias contribuem com os problemas da poluição ambiental, especialmente através da queima desses resíduos (Levine, 1996). No entanto, a enorme quantidade de biomassa vegetal residual pode ser utilizada para a conversão em diferentes produtos como: biocombustíveis, produtos químicos, melhoramento de ração animal e nutrição humana (Girio *et al*., 2010).

A biomassa lignocelulósica consiste em um complexo emaranhado, composto por três principais polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (Menon e Rao, 2012) (Figura 2). A celulose e a hemicelulose encontram-se envolvidas pela lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura à ataques químicos e enzimáticos. Em menores proporções, também podem ser encontrados na biomassa lignocelulósica, resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais (Dashtban *et al.*, 2009).

A celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina. A forma e o tamanho da parede celular dos materiais lignocelulósicos variam de espécie para espécie, bem como sua composição química. A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie, a época de colheita do vegetal e, ainda, entre as diferentes partes do mesmo vegetal.

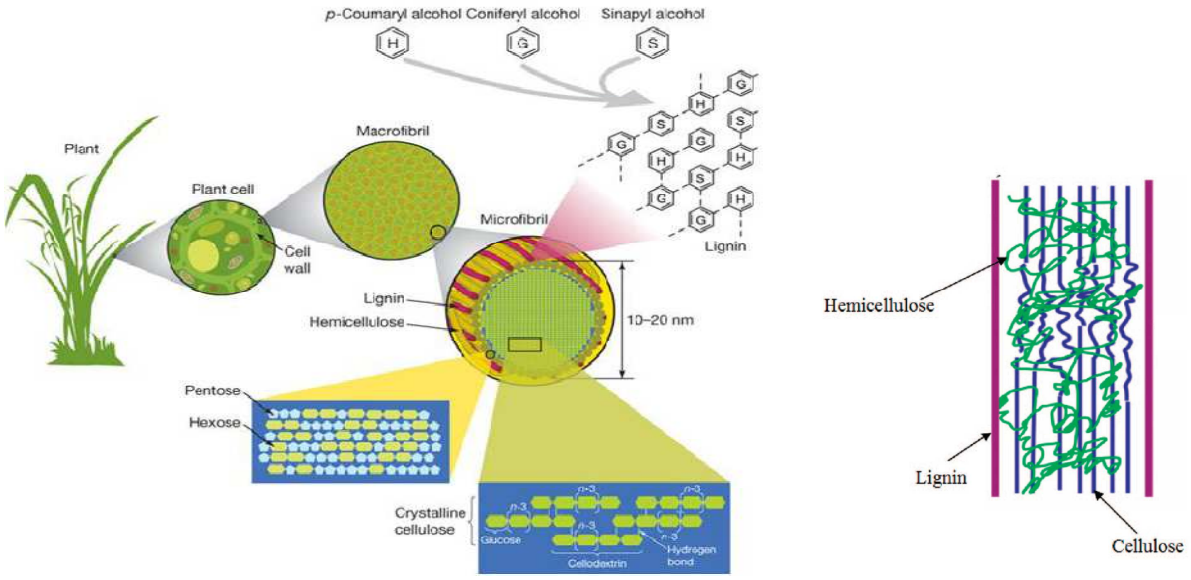

Figura 2: Constituintes da biomassa lignocelulósica. Fonte: Rubin, 2008.

2.1.1. Celulose

A celulose é a molécula mais abundante na natureza e merece um destaque especial entre as fontes de carbono utilizadas industrialmente. É um polímero de cadeia longa composta de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β-1,4 (Figura 3). Cada molécula de celulose é uma cadeia longa e não-ramificada de unidades de glicose com massa molecular variando de 50.000 a 2,5 milhões nas diferentes espécies, equivalendo de 300 mil a 15 mil resíduos de glicose. A estrutura linear possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação das cadeias celulósicas em fibras com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (Stöcker, 2008).

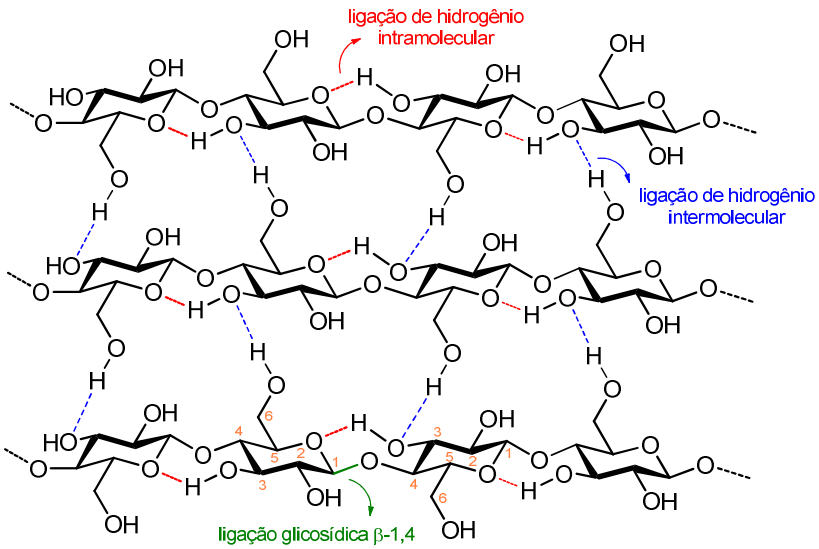

Figura 3: Estrutura tridimensional da celulose.

A celulose é um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas (cerca de 30 a 60 % do peso seco da planta) e não é digerível pelo homem. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose com a ajuda de bactérias que secretam celulases, enzimas que degradam a celulose.

A celulose é relativamente higroscópica e em condições atmosféricas normais (20 °C e 60 % de umidade relativa), absorve cerca de 8 a 14% de água. Porém, a molécula de celulose é insolúvel em água ou ácidos diluídos, mas em soluções de ácidos concentrados, a celulose pode sofrer degradação. Soluções alcalinas causam dissolução da porção de baixa massa molecular da celulose (Peixoto, 2006).

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose, o segundo maior constituinte da biomassa (20 a 40 %), é o outro componente essencial na parede celular das plantas. Esta macromolécula está intimamente ligada à celulose via ligações de hidrogênio, conferindo propriedades à parede celular e desempenhando funções de regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, a hemicelulose

está covalentemente ligada à lignina, formando juntamente com a celulose uma estrutura altamente complexa (Shallom e Shoham, 2003; Girio *et al*., 2010).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo composto por hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico) (Stöcker, 2008) (Figura 4).

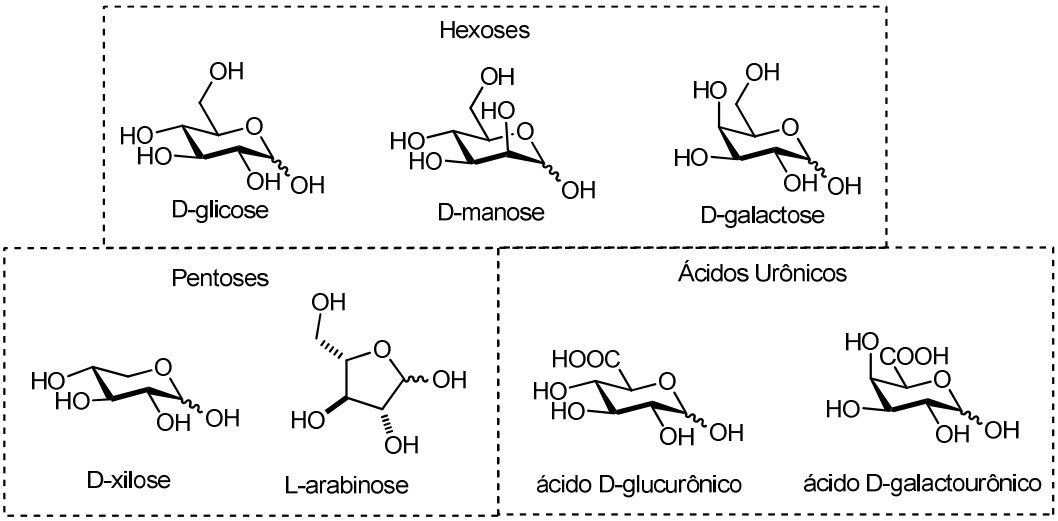

Figura 4: Constituintes da hemicelulose.

As hemiceluloses compreendem uma coleção heterogênea de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização muito inferior ao da celulose. Da mesma forma que a quantidade de hemicelulose varia de espécie para espécie, sua constituição também varia. Em madeiras duras, as hemiceluloses são constituídas principalmente de xilanas, enquanto que em madeiras moles as glucomanoses são mais comuns. A xilana possui uma cadeia principal formada por moléculas de xilose, unidas por ligação glicosídica β-1,4 e com cadeias laterais modificadas com diferentes grupos (Figura 5). Os tipos e quantidade dos substituintes ligados a essa cadeia principal variam dependendo do tipo do material lignocelulósico (Shallom e Shoham, 2003; Girio *et al*., 2010).

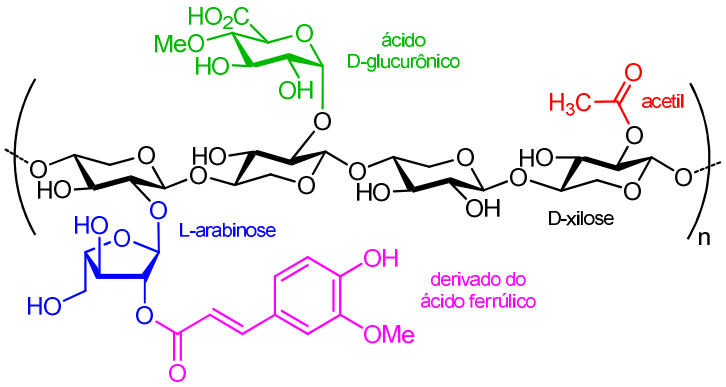

Figura 5: Estrutura da xilana.

A hemicelulose é estruturalmente parecida com a celulose, porém, é um material mais flexível, mas altamente resistente a espécies químicas. Estas macromoléculas são solúveis em água e facilmente solubilizadas em soluções alcalinas (Shallom e Shoham, 2003).

2.1.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula presente no material lignocelulósico (10 a 20 % na madeira), responsável pela robustez celular. Age como um material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática, levando a impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (Stöcker, 2008).

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional muito complexa, formada pela polimerização de três precursores monoméricos: álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapínico (Figura 6). A proporção destes três compostos resulta em diferentes tipos de lignina (Dashtban *et al.*, 2009).

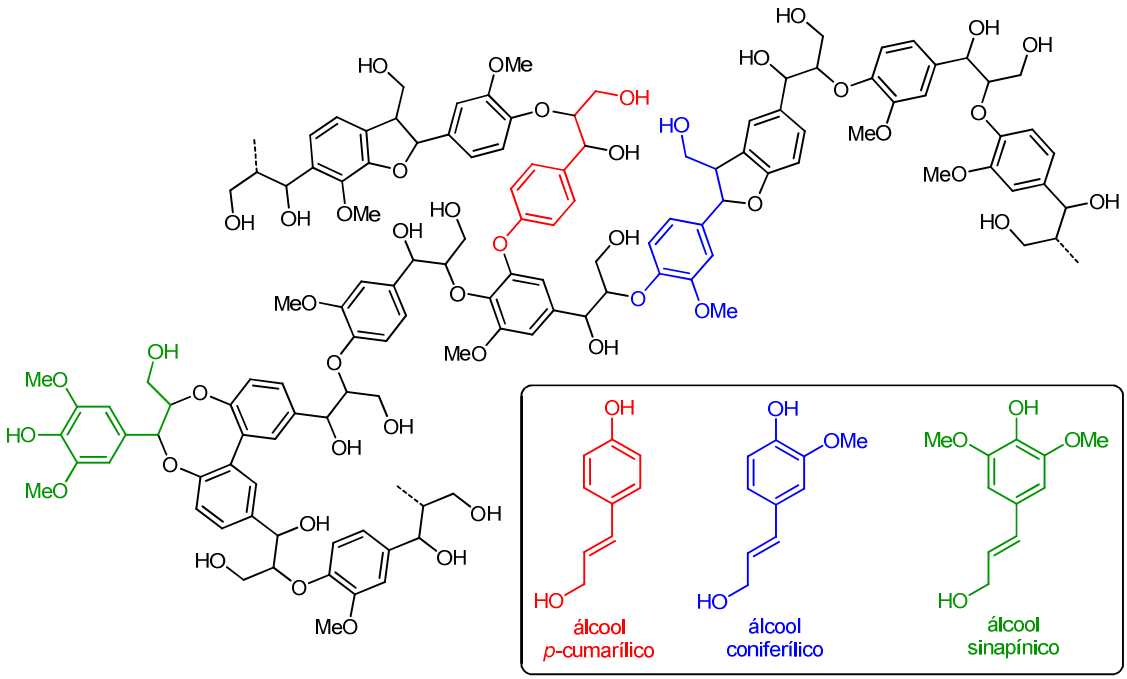

Figura 6: Precursores monoméricos da lignina e estrutura da lignina.

A lignina possui uma grande complexidade estrutural, o que faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de caracterizar quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja alterações estruturais durante a etapa de extração.

A lignina é a fração da biomassa não fermentável, por ser um polímero aromático heterogêneo, formado por ligações éter biologicamente estáveis. Devido a essa característica, atua como inibidor da fermentação microbiana em materiais lignocelulósicos. Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósicas (glicose) e hemicelulósicas (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa. Entretanto, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos monômeros constituintes com elevado grau de pureza (Aguiar Filho, 2008; Dashtban *et al.*, 2009).

2.2. Produção de etanol a partir do material lignocelulósico

A crescente demanda por energia oriunda de combustíveis fósseis tem motivado grandes preocupações, devido à alta dos preços e aos problemas ambientais causados por eles. Frente a isso, os biocombustíveis têm sido apontados como uma solução viável, por se tratar de um produto renovável, que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos na saúde pública.

Atualmente as principais fontes utilizadas para obtenção do etanol são cana-de-açúcar e grãos de milho. A desvantagem desses processos é a competição das grandes áreas férteis que também são utilizadas para a produção de alimentos. Nesse contexto, o uso de materiais lignocelulósicos, como bagaço da cana-de-açúcar, palhas de milho, rejeitos de madeira, entre outras, apresentam um enorme potencial para contribuir com esta tecnologia, já que podem ser obtidas em grandes quantidades a um baixo custo.

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para a obtenção de diversos produtos de interesse comercial, principalmente na produção de bioetanol de segunda geração.

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica compreende a seguintes etapas principais: pré-tratamento, hidrólise da celulose e hemicelulose, fermentação de açúcares e purificação do etanol para atender às especificações do combustível (Dashtban *et al.*, 2009) (Figura 7).

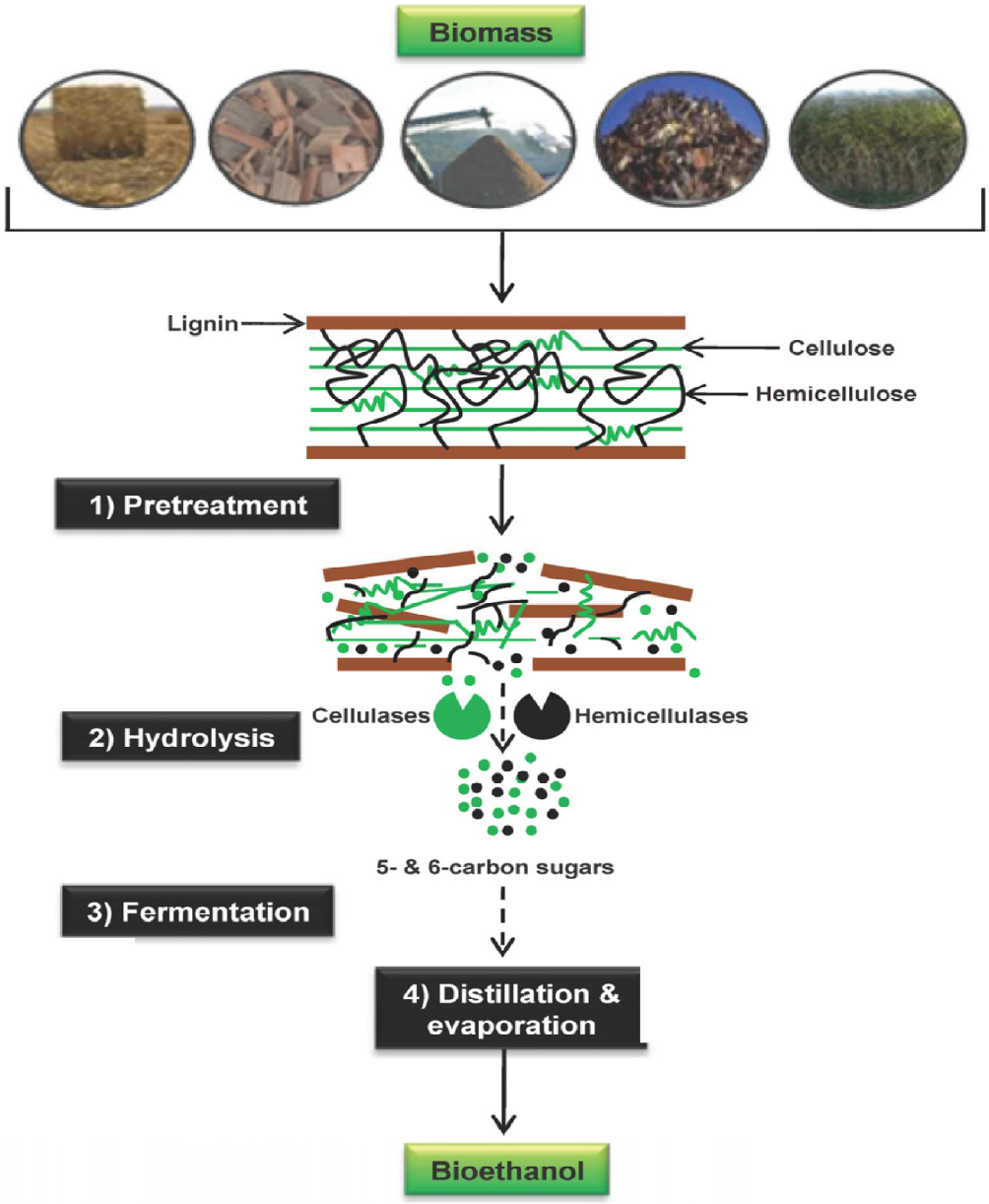

Figura 7: Principais etapas na produção de etanol a partir de material lignocelulósico. Fonte: Dashtban *et al.*, 2009.

2.2.1. Pré-tratamento

A tarefa de hidrolisar a (hemi)celulose para monossacarídeos fermentáveis é ainda tecnicamente problemática porque a digestibilidade da (hemi)celulose é dificultada por muitos fatores físico-químicos, estruturais e de composição. Uma das formas de facilitar o acesso das

enzimas à celulose e hemicelulose é através de um pré-tratamento.

O pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção de açúcares potencialmente fermentáveis na etapa de hidrólise e seu objetivo é alterar a estrutura da biomassa celulósica, tornando a celulose mais acessível para as enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis (Alvira *et al*., 2010). De forma geral, o processo visa remover a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentando a porosidade e a área superficial do material (Canilha *et al*., 2010) (Figura 8).

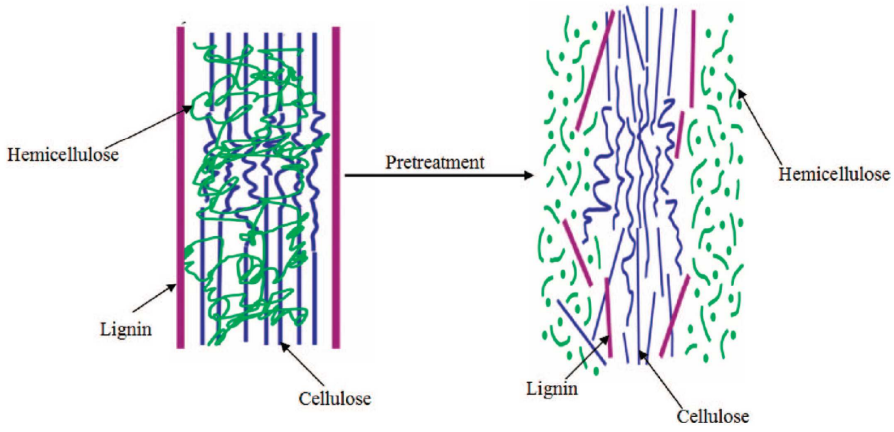

Figura 8: Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico. Fonte: http://biofueloutlook.blogspot.com.br/2008/11/more-about-lignocellulosic-biomass.html

Um processo de pré-tratamento universal é difícil de se imaginar devido à diversidade de matérias-primas de biomassas diferentes. Muitas tecnologias de pré-tratamento foram sugeridos durante as últimas décadas. Em relação a sua natureza podem ser classificados em três grupos principais: físicos, químicos e biológicos. Além disso, as combinações desses métodos também tem sido utilizadas.

Pré-tratamento Físico

O pré-tratamento físico consiste na redução do tamanho das partículas e cristalinidade do material lignocelulósico a fim de aumentar a superfície de contato e reduzir o seu grau de polimerização. São usadas técnicas de pulverização, trituração e moagem, dependendo do tamanho

da partícula final do material que se deseja. Diferentes processos de moagem podem ser usados para melhorar a hidrólise enzimática do material lignocelulósico. No entanto, a alta demanda de energia para a moagem e o aumento contínuo dos preços da energia dificultam a viabilidade desse processo (Kumar e Barrett, 2009; Cheng e Timilsina, 2011).

Pré-tratamento químico

Esse pré-tratamento utiliza ácidos ou bases para o processo de remoção da lignina e dissociação da hemicelulose, aumentando a acessibilidade das enzimas ao substrato celulósico. No processo ácido, o pré-tratamento pode ser realizado com ácidos diluídos ou concentrados. A utilização de ácido concentrado é menos atraente para a produção de etanol devido à formação de compostos que, futuramente, podem inibir a etapa de fermentação. Além disso, problemas de corrosão dos equipamentos e dificuldade na recuperação do ácido são desvantagens desse método. Os altos custos operacionais e de manutenção reduzem o interesse de aplicar o pré-tratamento com ácido concentrado em escala comercial. O uso de ácido diluído aparece como método mais favorável para aplicações industriais e pode ser feito por dois tipos de processos: a alta temperatura (temperaturas maiores que 160 ºC) e a baixa temperatura (temperaturas menores que 160 ºC) (Sun e Cheng, 2002). No entanto, dependendo da temperatura do processo, produtos da degradação de açúcares, tais como furfural e hidrometilfurfural (HMF) e compostos aromáticos provenientes da degradação de lignina são detectados e afetam o metabolismo de microrganismos na etapa de fermentação. De qualquer forma, este pré-tratamento gera uma menor quantidade de produtos de degradação, quando comparados aos pré-tratamentos com ácido concentrados (Cheng e Timilsina, 2011; Manrich, 2012).

Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento biológico utiliza micro-organismos, principalmente os fungos de podridão marrom e branco, que degradam a lignina e a hemicelulose. O pré-tratamento biológico oferece vantagens como o baixo custo, o baixo consumo de energia, nenhuma exigência de produtos

químicos e condições brandas. No entanto, o principal inconveniente para o desenvolvimento de métodos biológicos é a baixa taxa de hidrólise obtida na maioria dos materiais biológicos em comparação com outros pré-tratamentos (Zhao *et al*., 2002).

Dentre os processos citados, o pré-tratamento químico recebe maior atenção e é o mais utilizado por ser mais eficiente, mesmo resultando na maioria das vezes, em altas concentrações de produtos inibidores na etapa de fermentação, o que pode provocar efeito deletério sobre os micro-organismos utilizados na fermentação (Eggeman e Elander, 2005).

Após o pré-tratamento da biomassa é gerada uma fração líquida, composta por pentoses (xilose, arabinose), xilo-oligômeros (quando da aplicação de pré-tratamentos brandos) e hexoses (principalmente glicose) e uma fração sólida, que corresponde à lignina e a celulose não degradadas durante o pré-tratamento. A fração sólida necessita ser submetida a um processo de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentáveis (principalmente glicose), enquanto que a fração líquida poderá ser submetida à fermentação após o pré-tratamento, dependendo da concentração de pentoses e inibidores presentes (Alvira *et al*., 2010; Rabelo *et al*., 2013).

2.2.2. Hidrólise

A hidrólise da celulose e hemicelulose podem ser realizadas por tratamento ácido ou enzimático, levando a liberação dos açúcares fermentáveis (glicose, xilose, dentre outros).

A hidrólise ácida consiste em utilizar um ácido forte para atacar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos de um polissacarídeo. Os ácidos normalmente utilizados para a obtenção de hidrólise são ácido sulfúrico, ácido clorídrico e o ácido trifluoroacético. A hidrólise ácida foi a primeira alternativa a ser testada e apresentou inconvenientes como a produção de compostos furfúricos, que são inibidores da fermentação, e a degradação de açúcares por exposição prolongada

ao meio reacional. Frente aos empecilhos da utilização da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática tem recebido crescente atenção (Rivera *et al*., 2010).

A hidrólise enzimática é catalisada por enzimas altamente específicas. As enzimas que hidrolisam a celulose são chamadas de celulases e aquelas que hidrolisam hemicelulose são chamadas de hemicelulases.

O processo de hidrólise enzimática é considerado promissor para degradar polissacarídeos, pois é uma alternativa limpa e sustentável, apresenta maior eficiência de conversão, minimização da perda do substrato devido a modificações químicas e o uso de condições mais moderadas tais como baixas temperaturas de reação, pH neutro e uso de reagentes biodegradáveis, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado (Fernandez, 2009; Rabelo *et al.*, 2013).

2.2.2.1. Celulases

As celulases são biocatalisadores altamente específicos que atuam em conjunto, promovendo a hidrólise de materiais celulósicos, com liberação de glicose. O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo de celulases (Castro e Pereira, 2010; Goldbeck *et al*., 2012).

O processo de hidrólise da celulose ocorre em uma ação sinérgica de três principais componentes do complexo de celulases (Juturu e Wu, 2014) (Figura 9):

- As exoglucanases (EC 3.2.1.91) hidrolisam as cadeias celulósicas a partir de suas extremidades não redutoras, liberando celobioses. A atividade das exoglucanases é caracterizada por degradar celulose amorfa e quando puras podem degradar a celulose microcristalina insolúvel. As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, fenômeno que envolve a ruptura física do substrato (Dashtban *et al.*, 2010; Juturu e Wu, 2014).

- As endoglucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam as cadeias celulósicas internamente de maneira aleatória, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, consequentemente, novos terminais onde as exoglucanases atuam. A atividade das endoglucanases se caracteriza por realizar a hidrólise aleatória de ligações *β*-glicosídicas, causando uma rápida diminuição da viscosidade e aumento do número de grupos redutores (Dashtban *et al.*, 2010; Juturu e Wu, 2014).

- As celobiases (EC 3.2.1.21) hidrolisam as celobioses (dímeros de glicose) em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de oligossacarídeos. A taxa de hidrólise das celobiases aumenta proporcionalmente com a diminuição do tamanho da molécula do substrato (Juturu e Wu, 2014).

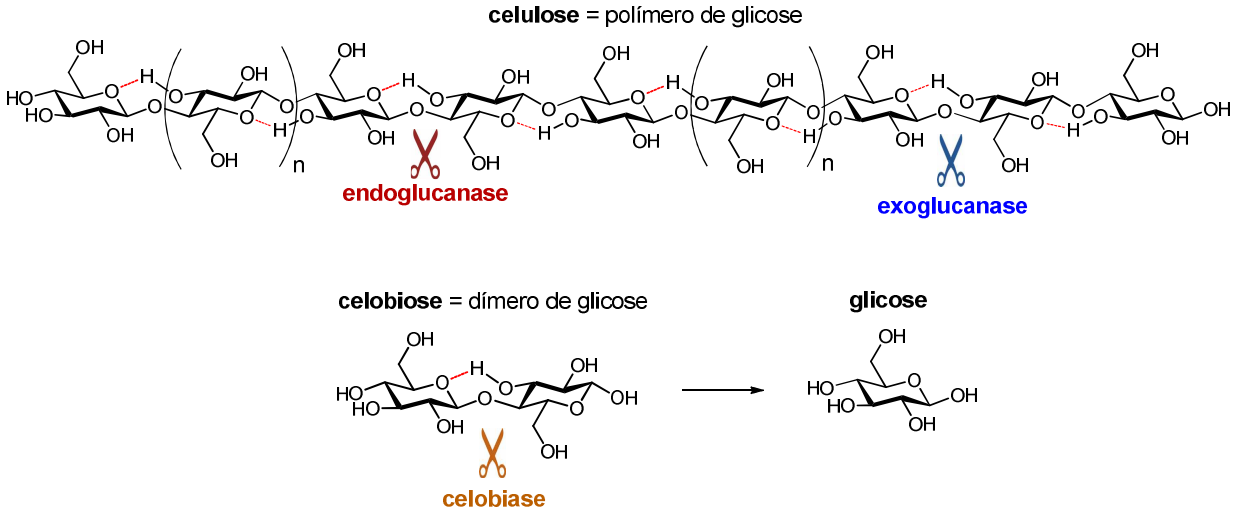

Figura 9: Esquema representativo da ação do complexo de celulases.

A celulose é mais facilmente hidrolisada pela ação combinada de endo e exoglucanases do que quando submetida à ação individual dessas enzimas, embora os passos do mecanismo de hidrólise da celulose ainda não sejam bem entendidos.

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos produtores de celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural até açúcares solúveis (Payne *et al.*, 2015). Muitos fungos e bactérias são citados por terem a capacidade de degradar a celulose, mas, muitas vezes, os produtos obtidos nesse processo são gás

carbônico e o metano (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). Os principais micro-organismos capazes de produzir celulases incluem fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium* e *Phoma*, bactérias aeróbias dos gêneros: *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, e anaeróbias dos gêneros: *Acetovibrio*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus e Thermoanaerobacter*) (Lynd e Zhang, 2002; Ten *et al*., 2004).

Os fungos filamentosos produzem celulases em meios que apresentam valores de pH ótimos na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que as bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em meios com faixas de pH alcalinos. A temperatura ótima de atuação destas enzimas encontra-se, em sua maioria, acima de 40 ºC (Castro e Pereira, 2010).

Entre os fungos celulolíticos, *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. são os micro-organismos mais estudados e de maior importância industrial devido à alta capacidade de secretar enzimas que degradam a celulose. *Trichoderma reesei* produz pelo menos seis enzimas geneticamente diferentes e importantes no processo de degradação do material celulósico: duas celobiohidrolases e quatro endoglucanases (Gottschalk *et al*., 2010).

Muitas vezes um mesmo micro-organismo é testado nas etapas de pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico, com o objetivo de realizar todo o processo até a produção de açúcares fermentáveis. Nesse contexto, o micro-organismo *T. reesei* é descrito na literatura como um bom produtor de celulases e hemicelulases, mas é incapaz de degradar a lignina. Já, basidiomicetos de podridão branca são considerados mais eficazes na degradação da lignina. Por exemplo, o *Phanerochaete chrysosporium* é o fungo mais estudado e produz um complexo de enzimas lignocelulolíticas em grandes quantidades (Gottschalk *et al*., 2010; Florencio, 2011).

Algumas espécies de *Acremonium* sp. também foram estudadas quanto a produção de celulases e hemicelulases. Almeida (2009) estudou a produção de celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium* endofíticos, a partir da degradação de bagaço de cana e palha de milho. O

micro-organismo *Acremonium* sp. EA0810, quando testado para a atividade da endoglucanase, apresentou alta atividade enzimática em pH neutro e termoestabilidade, despertando promissor interesse na aplicação.

Recentemente, leveduras silvestres brasileiras isoladas de diferentes regiões no Brasil foram avaliadas e identificadas como potenciais produtoras de celulases (Peixoto, 2006). As atividades celulolíticas das leveduras estudadas ainda são inferiores quando comparadas aos fungos filamentosos, mas esses resultados mostram que leveduras são capazes de produzir enzimas de grande interesse biotecnológico, como as celulases.

O sucesso na produção enzimática por micro-organismos requer um conhecimento detalhado não apenas das características de crescimento e fisiologia do micro-organismo em questão, mas também saber entender que cada fungo possui suas próprias características anatômicas, morfológicas e fisiológicas (Goldbeck *et al*., 2013).

2.2.2.2. Hemicelulases

As hemicelulases são componentes indispensáveis na degradação do material lignocelulósico. O substrato dessas enzimas, as hemiceluloses, é um grupo heterogêneo de polissacarídeos lineares e ramificados que são ligados via ligação de hidrogênio às microfibras de celulose na parede celular da planta. As hemiceluloses também são covalentemente ligadas a lignina, formando com a celulose uma estrutura altamente complexa. Por estar associada a celulose e a lignina, por possuir alto peso molecular e ser insolúvel em água, a degradação da hemicelulose impõe vários desafios para os micro-organismos. Além disso, como a hemicelulose apresenta estruturas com diferentes tipos de composição química, sua hidrólise completa requer um número bastante grande de diferentes enzimas. Para a hidrólise enzimática da hemicelulose é necessária a ação combinada de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares (Shallom e Shoham, 2003).

A hemicelulose é composta principalmente por polímeros de xilose (xilanas) e de arabinose (arabinanas), com pequena quantidade de outras pentoses ou hexoses na sua estrutura. As hemicelulases são responsáveis por hidrolisar as xilanas, arabinanas e arabinoxilanas até xilose, arabinose e oligossacarídeos de baixa massa molecular. A xilana apresenta uma cadeia principal composta de monômeros de xilose unidas por ligações glicosídicas *β*-1,4. Os tipos e quantidade dos substituintes ligados a essa cadeia principal variam dependendo do tipo do material lignocelulósico. Para a hidrólise da xilana é necessária a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, as endoxilanases (EC 3.2.1.8) e as *β*-xilosidases (EC 3.2.1.37), que atuam na cadeia principal. As endoxilanases hidrolisam aleatoriamente as cadeias poliméricas de xilose e as *β*-xilosidades hidrolisam dímeros de xilose. Dependendo do tipo de xilana, podem ser também necessárias enzimas auxiliares para a clivagem das cadeias laterais, como α-D-glucuronidases (EC 3.2.1.131) e acetil-xilanaesterases (EC 3.1.1.72), entre outras (Girio *et al.*, 2010; Ogeda e Petri, 2010) (Figura 10).

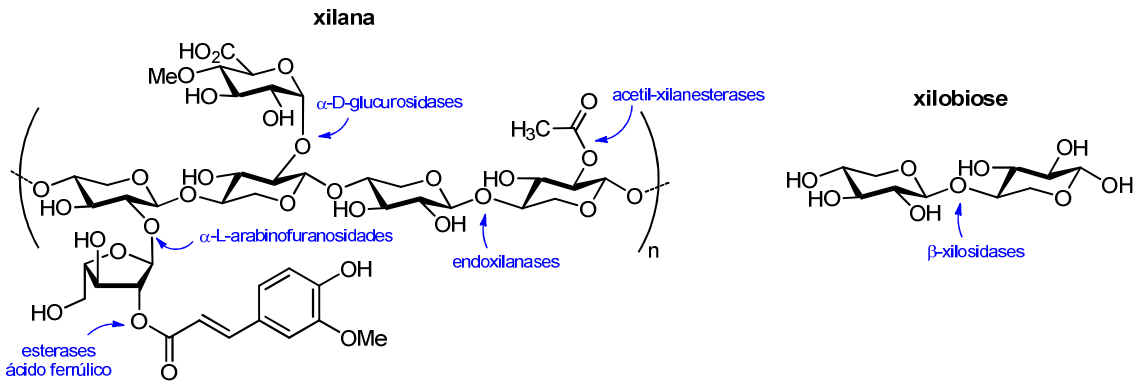

Figura 10: Estrutura da xilana e xilobiose e enzimas responsáveis pela sua degradação.

As endoxilanases podem ser produzidas principalmente por micro-organismos, como bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras (Haltrich *et al.*, 1996). Os extratos enzimáticos, obtidos de culturas de fungos filametosos, geralmente possuem atividade maior do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disso, os

fungos possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, permitindo assim, hidrolisar não somente a cadeia principal da xilana, mas também, as suas ramificações (Haltrich *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 1999). A produção de endoxilanases por fungos filamentosos está relatada para espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Melanocarpus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermoascus e Thermomyces.* Enquanto que, a produção por bactérias está limitada a poucas espécies como, por exemplo, as pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Streptomyces e Staphylococcus* (Palma, 2003).

2.2.3. Fermentação

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir do caldo da cana de açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassa lignocelulósica, a fermentação é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil.

A fermentação etanólica é um fenômeno bioquímico muito complexo, que ocorre através da ação de leveduras sobre os açúcares fermentáveis que estão contidos na solução. Nesse processo, a glicose é convertida em piruvato pela glicólise e o piruvato, por sua vez, é convertido em etanol e gás carbônico em duas etapas (Nelson e Cox *et al.*, 2008) (Figura 11). Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, levando à formação de acetaldeído e liberação de CO_2. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase e NADH. O objetivo da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar energia para ser empregada na realização das suas diversas funções fisiológicas e biossínteses necessárias à manutenção da sua vida, crescimento e multiplicação. O etanol e o CO_2 gerados no processo são resultantes dos produtos de excreção e sem importância metabólica para a célula (Lima *et al*., 2001).

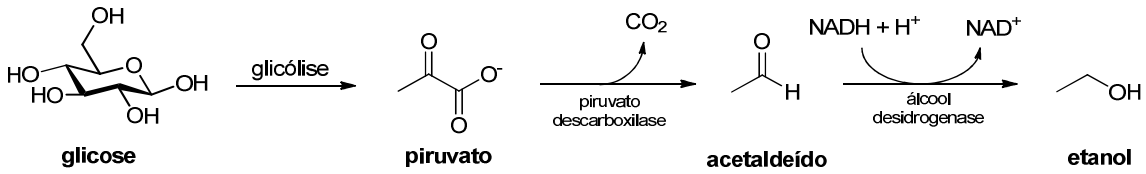

Figura 11: Fermentação etanólica.

Saccharomyces cerevisiae é a levedura mais utilizada na produção de etanol e apresenta alta eficiência fermentativa. Essa levedura apresenta eficiência na fermentação devido a sua alta capacidade de fermentar os açúcares mesmo na presença de oxigênio e de tolerar altas concentrações de etanol na fase final da fermentação, baixos níveis de pH do meio, o estresse osmótico provocado pelas altas concentrações dos açúcares e a pressão hidrostática ocasionada pelo grande volume de líquido contido nas dornas de fermentação. Apesar dessas características, estudos são realizados na busca por melhorias das características dessa levedura ou na melhoria no processo de produção de etanol, com o objetivo de aumentar os rendimentos e a produtividade (Girio *et al*.; 2010; Cheng e Timilsina, 2011).

A fermentação alcóolica por bactérias, como a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas as leveduras são ditas economicamente mais importantes e são os agentes mais utilizados (Cheng e Timilsina, 2011).

No processo de fermentação do hidrolisado celulósico para a produção de etanol, a principal espécie utilizada é *S. cerevisiae*. Na produção de etanol a partir de material celulósico, o maior problema é que os micro-organismos produtores de etanol não conseguem utilizar mais do que 30 a 60 % dos materiais lignocelulósicos. Isso ocorre devido ao fato que o material lignocelulósico é formado de 30 a 60 % de celulose, 20 a 40 % de hemicelulose e 10 a 20 % de lignina e os micro-organismos, e leveduras como *S. cerevisiae*, só conseguem metabolizar os produtos da degradação da celulose (glicose) e nesse processo o rendimento de etanol é baixo, em torno de 20 %. O processo se tornaria mais interessante e viável quando os açúcares constituintes da hemicelulose, as

pentoses, também fossem metabolizados, aumentando assim o rendimento do processo. Portanto, a produção do etanol de segunda geração depende da eficiência da fermentação tanto da glicose quanto da xilose, e as cepas selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de fermentar a xilose (Landry *et al*., 2006; Matsushika *et al*., 2009).

O grande benefício do etanol elaborado a partir da celulose é que praticamente qualquer elemento vegetal como talos e grãos de culturas anuais, serragem, lascas de madeira, plantas nativas perenes crescidas em terras marginais aos cultivos, poderiam converter-se em bioetanol (Fugita, 2010).

A conversão das hexoses à etanol é um processo bem consolidado industrialmente, empregando a levedura *S. cerevisiae*, porém, a produção de etanol de segunda geração ainda não é um processo eficiente, já que esta levedura não consegue converter as pentoses à etanol (Merico *et al.*, 2007). Esforços vêm sendo realizados na busca por linhagens modificadas de *S. cerevisiae*, que consigam utilizar as pentoses presentes nos hidrolisados, mas estas linhagens tem-se apresentado muito sensíveis aos hidrolisados presentes no meio (Hahn-Hagerdal *et al*., 2007; Varize, 2013).

As propriedades desejadas em um micro-organismo para a fermentação de hidrolisados do material lignocelulósico são: eficiência na utilização de hexoses e pentoses, rápidas taxas de fermentação, alta produção de etanol, alta tolerância ao etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado, fermentação em valores baixos de pH e a altas temperaturas, alta viabilidade e rentabilidade e utilização de uma ampla variedade de substratos (Pasha *et al.*, 2007).

Os microrganismos capazes de fermentar pentoses são mais restritos em relação aos fermentadores de hexoses. Os micro-organismos capazes de fermentar pentoses presentes na biomassa hemicelulósica podem ser divididos em dois grupos: micro-organismos naturalmente fermentadores e microrganismos geneticamente modificados. Os micro-organismos naturalmente fermentadores incluem diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os gêneros de leveduras naturalmente fermentadoras são, principalmente, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*,

Debaryomyces, *Schawannyomyces*, entre outras. Organismos geneticamente modificados com capacidade de fermentação de pentoses incluem linhagens de *S. cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Z. mobilis* (Cheng e Timilsina, 2011; Shupe e Liu, 2012; Menon e Rao, 2012).

Segundo Van Vleet e Jeffries (2009) a levedura *Pichia stipitis* é citada como a mais promissora para a bioconversão da biomassa em etanol, apresentando capacidade para fermentar xilose, e também, outros açúcares como glicose, manose, galactose e celobiose Entretanto, até o momento, nenhum micro-organismo capaz de satisfazer todas as características desejadas foi encontrado ou desenvolvido. Particularmente, a fermentação de pentoses representa um desafio único, e a obtenção de organismos eficientes para a fermentação tem sido perseguido nas últimas décadas. Dessa forma, o futuro depende da descoberta e obtenção de micro-organismos e enzimas de menor custo e mais eficientes para emprego no processo fermentativo do etanol de segunda geração. Economicamente, é essencial que tanto a glicose quanto a xilose presentes na biomassa lignocelulósica possam ser fermentados em etanol, para que esses recursos renováveis possam ser aproveitados ao máximo (Menon e Rao, 2012).

Durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica vários subprodutos químicos são gerados, e estes podem inibir os micro-organismos fermentativos. Entre muitos compostos inibidores que podem ser formados, destacam-se o 2-furaldeído (furfural) e o 5-hidroximetil-2-furaldeído (5-hidroximetilfurfural, HMF) que são produzidos durante o pré-tratamento da biomassa, especialmente com ácido. Estes compostos podem danificar as paredes e membranas celulares, inibir o crescimento celular, reduzir as atividades enzimáticas, causar danos ao DNA, inibir a síntese de RNA e proteínas e reduzir a produção de etanol (Van Maris *et al*., 2006; Cadete *et al*., 2012; Liu e Song., 2009). A maioria das leveduras, incluindo linhagens industriais, são suscetíveis aos furfurais derivados do pré-tratamento, e especialmente suscetíveis a combinação destes inibidores. Neste sentido, para atenuar os efeitos dos inibidores, tratamentos adicionais são requeridos, incluindo detoxificação química, física ou bioquímica. No entanto, esses passos

adicionais elevam o custo e complexidade ao processo e geram resíduos. Portanto, o desenvolvimento de linhagens geneticamente modificadas, com maior tolerância a inibidores, especialmente aos furfurais, é uma alternativa promissora à etapa de detoxificação adicional (Liu *et al.*, 2004; Chandell *et al*., 2007).

O etanol acumulado no meio de cultura também pode ser um problema para alguns micro-organismos e ser um fator de estresse significativo durante a fermentação. O etanol é um inibidor do crescimento de leveduras em concentrações relativamente baixas, inibe a divisão celular, diminuindo o volume celular e a taxa de crescimento, enquanto em altas concentrações pode reduzir a viabilidade celular e aumentar a morte.

Esforços têm sido feitos na identificação de linhagens de leveduras que sejam termotolerantes, tolerantes ao etanol, resistentes a inibidores liberados durante a hidrólise e o pré-tratamento do material lignocelulósico e capazes de utilizar um amplo espectro de substratos, produzindo grandes quantidades de etanol na temperatura ótima para a realização da sacarificação. Leveduras industriais devem detectar e responder rapidamente às condições de estresse, adaptando-se aos fatores ambientais adversos por meio do ajuste de suas atividades metabólicas, a fim de evitar uma perda substancial de viabilidade. A capacidade de tolerar vários estresses é um dos importantes critérios para selecionar uma linhagem que seja eficiente no processo fermentativo (Stanley *et al*., 2010).

2.3. Micro-organismos silvestres brasileiros

Os micro-organismos estão presentes em toda biosfera e possuem capacidade de colonizar os mais variados habitats do planeta. São importantes para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, devido à sua diversidade metabólica. A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seu ambiente. Além disso, representam

uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável (Rodrigues, 2008).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do Planeta, possui uma área de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, com variadas zonas climáticas, que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas e a variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira (Goldbeck *et al*., 2012). Devido à grande biodiversidade brasileira, as espécies pertencentes à fauna e flora talvez não venham a ser conhecidas em sua totalidade, entretanto, sabe-se que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezenas de milhões. A diversidade de bactérias e fungos conhecida refere-se, em especial, a espécies patogênicas para humanos, animais domésticos e plantações (Hargreaves, 2008).

O isolamento de micro-organismos a partir de recursos naturais sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse à indústria alimentícia, farmacêutica e química. A aplicação industrial de micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, resultam em aplicações extremamente diversificadas e com significativo impacto econômico (Soares *et al*., 2010).

A bioprospecção de micro-organismos a partir dos biomas brasileiros pode contribuir com a aquisição de linhagens selvagens com potencial biotecnológico. Neste sentido, pode-se destacar que uma enorme parcela do patrimônio genético brasileiro encontra-se na Mata Atlântica, que ainda precisa ser mais bem conhecida (Goldbeck *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar a bioprospecção de micro-organismos provenientes de diversos ambientes florestais brasileiros, visando a obtenção de isolados com potencial para a utilização na síntese de bioetanol.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar micro-organismos silvestres com capacidade de produzir celulases;
- Identificar molecularmente os micro-organismos selecionados com o maior potencial para produção de celulases;
- Selecionar micro-organismos silvestres que apresentem capacidade de produzir xilanases;
- Selecionar micro-organismos com capacidade de fermentar pentoses (xilose e arabinose).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos utilizados

Para a seleção e avaliação do potencial lignocelulósico foram testadas 142 leveduras provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (CBiot/UFRGS) que foram isolados de regiões da Mata Atlântica, RS, e 38 leveduras provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Roraima (UFRR) oriundos da Floresta Amazônica, RR.

Além dos fungos oriundos das coleções de culturas, acima relatados, foram coletadas amostras de solo em diferentes locais (alambique) no município de Jaboticaba, RS. As amostras foram retiradas de uma camada de até 20 cm do solo e acondicionadas em sacos plásticos novos devidamente identificados. Os isolamentos foram feitos por diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo. Para isso, uma subamostra de 5 g de solo foi suspensa em 40 mL de uma solução de PBS (0,85 % de NaCl) estéril. Diluições decimais sucessivas (10^{-1} a 10^{-4}) foram realizadas e então uma alíquota de 50 µL de cada diluição foi semeada por espalhamento em placas de Petri com meio contendo 20 g/L de CMC ou Xilana de birchwood (Sigma), 10 g/L peptona, 15 g/L ágar e adicionado ao meio 0,07 g/L de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa a 30 ^{o}C por até 5 dias. As colônias de micro-organismos que se desenvolveram nestas condições foram transferidas para meios frescos, sendo estas isoladas pela técnica de esgotamento, a fim de se obter colônias puras.

Na Tabela 1 estão listados as leveduras que foram utilizadas para a avaliação da capacidade de degradar material lignocelulósico e na Tabela 2 estão listados os isolados de solo de alambique que foram capazes de crescer em meios contendo CMC ou xilana.

Tabela 1: Relação das leveduras testadas durante o processo de avaliação do potencial lignocelulósico.

Linhagens	Identificação Molecular	Linhagens	Identificação Molecular
34	sem identificação	Ma23c	*Debaryomyces* sp.
10CE	*Saccharomyces cerevisiae*	Ma23d	*Candida litsaeae*
11c	sem identificação	Ma24a	*Candida* sp.
11CE	*Saccharomyces cerevisiae*	Ma24b	*Pichia scolyti*
12M	sem identificação	Ma26a	*Debaryomyces nepalensis*
13PP	sem identificação	Ma27a	*Kockovaella thailandica*
15PP	sem identificação	Ma27b	*Candida railenensis*
16PP	sem identificação	Ma28b	sem identificação
18a	*Candida* sp.	Ma30a	*Debaryomyces nepalensis*
19PP	sem identificação	Ma30b	*Candida litsaeae*
20a	*Pichia myanmaensis*	Ma30c	*Candida fennica*
20c	*Candida litsaeae*	Ma41b	*Pichia* sp.
21a	sem identificação	Ma41c	*Debaryomyces hansenii*
21e	*Candida ishiwadae*	Ma42b	*Pichia scolyti*
23PP	sem identificação	Ma42e	*Debaryomyces hansenii*
24PP	sem identificação	Ma43a	*Trichosporon* sp.
25PP	sem identificação	Ma43b	*Candida* sp.
26PP	sem identificação	Ma44a	*Debaryomyces hansenii*
27a	*Pichia anomala*	Ma45a	*Debaryomyces* sp.
33CE	*Saccharomyces cerevisiae*	Ma45d	*Rhodotorula minuta*
33e	*Candida kofuensis*	Ma45dd	sem identificação
36b	*Debaryomyces* sp.	Ma46a	*Debaryomyces hansenii*
37a	*Lipomyces starkeyi*	Ma46c	*Candida* sp.
38a	*Pichia scolyti*	Ma47a	*Zygozyma* sp.
38b	*Candida auringiensis*	Ma47b	*Hanseniaspora* sp.
39a	*Debaryomyces castelli*	Ma48a	*Debaryomyces* sp.
39b	*Pichia acaciae*	Ma49a	*Candida* sp.
41a	*Pichia* sp.	Ma49b	*Debaryomyces yamadae*
41PP	sem identificação	Ma49c	sem identificação
43c	*Pichia subpelliculosa*	Ma49d	*Pichia* sp.
44b	*Candida* sp.	Ma50b	*Candida* sp.
45b	*Rhodotorula mucilaginosa*	Ma61a	*Pichia* sp.

Cont. Tabela 1

Linhagens	Identificação Molecular	Linhagens	Identificação Molecular
46a	*Candida* sp.	Ma62d	sem identificação
48a	*Pichia scolyti*	Ma62g	*Pichia* sp.
48d	*Pichia scolyti*	Ma64b	sem identificação
48e	*Pichia* sp.	Ma64c	*Rhodotorula* sp.
50a	*Hanseniaspora occidentalis*	Ma65b	*Debaryomyces* sp.
51a	*Debaryomyces hansenii*	Ma65d	*Rhodotorula* sp.
51b	*Lipomyces* sp.	Ma67c	*Candida* sp.
54b	*Candida* sp.	Ma68c	*Debaryomyces hansenii*
54c	*Candida* sp.	Ma70b	*Pichia* sp.
55a	*Rhodotorula mucilaginosa*	P.h.	*Pseudozima hubeiensis*
55aa	sem identificação	P.p.	*Pichia pastoris*
55b	*Pichia* sp.	P.s.	*Pichia stipitis*
55d	sem identificação	QU13	sem identificação
56c	*Pichia* sp.	QU20	sem identificação
57a	*Candida* sp.	QU31	sem identificação
58a	*Candida* sp.	QU33	sem identificação
58b	*Pichia* sp.	Qu34	sem identificação
6b	*Candida litsaeae*	QU67	sem identificação
6d	sem identificação	RR03	*Saccharomyces cerevisiae*
6e	*Candida* sp.	RR118a	sem identificação
A.s.	*Acremonium strictun*	RR118b	sem identificação
A26a	sem identificação	RR120	*Rhodotorula minuta*
B1	sem identificação	RR132	*Cryptococcus hungaricus*
E14a	*Candida litsaeae*	RR142	*Rhodosporidium glutinis*
E15a	*Rhodotorula mucilaginosa*	RR146	*Rhodotorula minuta*
E15c	*Candida pararugosa*	RR148	*Cryptococcus albidus*
E9a	*Pichia scolyti*	RR200	*Sporobolomyces shibatanus*
Ep11a	*Pichia scolyti*	RR214	*Candida valida*
Ep11b	*Pichia subpelliculosa*	RR217	*Candida famata*
Ep13b	*Debaryomyces hansenii*	RR22	*Rhodotorula minuta*
Ep15b	*Williopsis californica*	RR23	*Candida oleophila*
Ep15c	sem identificação	RR230	*Debaryomyces hansenii*

Cont. Tabela 1

Linhagens	Identificação Molecular	Linhagens	Identificação Molecular
Ep15d	sem identificação	RR233	*Candida colliculosa*
Ep171	sem identificação	RR244	sem identificação
Ep17a	*Candida parapsilosis*	RR25	*Candida oleophila*
Ep17b	*Rhodotorula mucilaginosa*	RR263	*Rhodotorula mucilaginosa*
Ep17d	*Torulaspora pretoriensis*	RR267	*Cryptococcus laurentii*
Ep1a	*Debaryomyces hansenii*	RR278	sem identificação
Ep1b	*Debaryomyces* sp.	RR30	*Candida famata*
Ep1d	*Debaryomyces maramus*	RR41	*Williopsis saturnus*
Ep3a	*Debaryomyces hansenii*	RR44	*Candida famata*
Ep4a	*Pichia* sp.	RR46	sem identificação
Ep4c	sem identificação	RR48	*Debaryomyces hansenii*
Ep4d	*Sporobolomyces roseus*	RR49	*Rhodotorula glutinis*
Ep5b	*Debaryomyces hansenii*	RR50	*Rhodotorula minuta*
Ep6b	*Candida litsaeae*	RR51	*Rhodotorula mucilaginosa*
Ep7c	*Debaryomyces* sp.	RR54	*Cryptococcus laurentii*
Ep8c	sem identificação	RR56	*Rhodotorula mucilaginosa*
Ep8d	*Rhodotorula mucilaginosa*	RR62	*Sporobolomyces roseus*
Ep9a	*Debaryomyces* sp.	RR71	*Trichosporon asteroides*
Ep9b	*Pichia scolyti*	RR74	*Rhodotorula glutinis*
Ep9c	*Debaryomyces* sp.	RR84	*Cryptococcus hungaricus*
Ma12c	*Candida litsaeae*	VR138	sem identificação
Ma12d	*Candida pomicola*	VR19	sem identificação
Ma12e	*Pichia scolyti*	VR242	sem identificação
Ma21a	sem identificação	VR52	sem identificação
Ma23a	*Debaryomyces* sp.	YLL	*Yarrowia lipolytica*

Tabela 2: Relação de isolados de solo de alambique testados durante o processo de avaliação do potencial lignocelulósico.

Isolados	Identificação Molecular	Isolados	Identificação Molecular
T10	sem identificação	T7C	sem identificação
T10J	sem identificação	T7EE	sem identificação
T10L	sem identificação	T7F	sem identificação
T1F	sem identificação	T8A	sem identificação
T1H	sem identificação	T8B	sem identificação
T2A	sem identificação	T8G	sem identificação
T2AA	sem identificação	T9A	sem identificação
T2F	sem identificação	T9B	sem identificação
T2H	sem identificação	T9C	sem identificação
T2HH	sem identificação	T9D	sem identificação
T2I	sem identificação	T9E	sem identificação
T2L	sem identificação	T9G	sem identificação
T2R	sem identificação	T9I	sem identificação
T2X	sem identificação	T9L	sem identificação
T3	sem identificação	T9M	sem identificação
T3A	sem identificação	T9P	sem identificação
T3AA	sem identificação	T9Z	sem identificação
T3AB	sem identificação	TE10	sem identificação
T3AC	sem identificação	TE11	sem identificação
T3AD	sem identificação	TE13	sem identificação
T3B	sem identificação	TE14	sem identificação
T3F	sem identificação	TE15	sem identificação
T3G	sem identificação	TE2	sem identificação
T3KK	sem identificação	TE4	sem identificação
T3LL	sem identificação	TE5	sem identificação
T3U	sem identificação	TE6	sem identificação
T5L	sem identificação	TE7	sem identificação
T6I	sem identificação	TE8	sem identificação
T6X	sem identificação		

4.2. Meio para Manutenção Celular

A manutenção das linhagens de micro-organismos foi realizada por repiques periódicos em placas de Petri contendo o meio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) - Peptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, Glicose 20 g/L, Ágar 20 g/L. Os micro-organismos foram incubados em estufa a 30 ^{o}C por 3 a 5 dias e após mantidas a 5 ^{o}C (cultura estoque).

4.3. Triagem dos micro-organismos produtores de celulases em meio sólido

O teste seguiu a metodologia utilizada por Peixoto (2006) em relação à composição do meio de cultura e processo de triagem. O meio de cultivo continha como única fonte de carbono a carboximetilcelulose (CMC) comercial (Sigma). Para a verificação da capacidade dos micro-organismos em produzir CMCases a composição do meio está descrita na Tabela 3:

Tabela 3: Composição do meio de triagem em placas de Petri.

Composição do meio	Concentrações (g/L)
Carboximetilcelulose (CMC)	10
Extrato de levedura	0,6
KH_2PO_4	7,0
K_2HPO_4	2,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
Ágar	15,0
O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.	

Os meios de cultivo sólidos foram esterilizados, vertidos em placas de Petri e, após a solidificação do meio nas placas, foram utilizadas para a inoculação. Os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri individuais onde, no centro de cada placa, foram feitas a inoculação

com alça de repicagem em forma de agulha, e identificadas conforme o código de cada micro-organismo. Foram incubadas em estufa a 30 ^{o}C em um período de 3 a 5 dias, para posterior revelação com vermelho de Congo.

Os micro-organismos que obtiveram crescimento no meio de triagem com CMC foram utilizados para a revelação das placas com uma solução de vermelho de Congo. A composição do meio continha vermelho de Congo (1,4 g/L) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. As placas foram cobertas com essa solução que foi mantida por 30 minutos, descartada e o ágar foi recoberto por uma solução de NaCl 0,5 M no mesmo tampão por mais 30 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada.

As linhagens produtoras de carboximetilcelulase (CMCase) foram selecionadas por meio da observação de um halo descolorido ao redor da colônia, indicativo de que houve áreas de hidrólise da CMC. A formação do halo descolorido segue a proposta de Anagnostakis e Hankin (1975), onde a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia expressa o índice enzimático de atividade (IEA), conforme a equação seguinte:

$$IEA = \frac{diâmetro\ do\ halo\ descolorido\ (cm)}{diâmetro\ da\ colônia\ (cm)} \qquad \text{[eq. 01]}$$

As linhagens que apresentaram halo de degradação ao redor da colônia foram consideradas potenciais produtoras de celulases, sem distinção em relação ao tamanho do halo. Como micro-organismo de referência foram utilizados *Acremonium strictum* e *T. reesei*, descritos na literatura como produtores de celulases.

4.4. Atividade celulolítica em meios líquidos

Após a realização dos ensaios em meios sólidos e a seleção dos micro-organismos que apresentaram formação de halo ao redor da colônia, foram realizados testes em meios de cultura líquidos para produção enzimática, a partir do substrato comercial de celulose microcristalina (Sigma) como única fonte de carbono. Na Tabela 4, está listada a composição do meio líquido para a produção enzimática.

Tabela 4: Composição do meio líquido para produção enzimática

Composição do meio	Concentrações (g/L)
Celulose	20
Extrato de levedura	0,6
KH_2PO_4	7,0
K_2HPO_4	2,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.	

Para serem utilizados em meio líquido foi necessário inicial crescimento dos micro-organismos em meio GYMP (2 % de Glicose, 0,5 % de Extrato de levedura, 0,2 % de Fosfato de Sódio Monobásico) sólido (1,5% de ágar) por 96 h. Após esse período, uma alçada de cada micro-organismo foi transferida para o meio líquido previamente identificado. Foram então submetidos a agitação de 150 rpm, sob temperatura controlada de 30 ^{o}C. O processo de produção enzimática decorreu com coletas de alíquotas nos tempos de 24 até 360 h, com intervalos de coletas de alíquotas a cada 24 h.

As alíquotas coletadas foram submetidas à centrifugação de 10000 rpm, temperatura de 5 ^{o}C por 20 minutos. O sobrenadante que continha a enzima produzida extracelularmente foi separado, identificado e estocado sob congelamento em freezer para posterior utilização em testes de

atividade enzimática.

Para a verificação da capacidade hidrolítica de cada enzima centrifugada foram realizados três diferentes experimentos seguindo a metodologia de Peixoto (2006) e Goldbeck (2012).

4.5. Determinações quantitativas

4.5.1. Atividade CMCase

A atividade enzimática foi realizada a partir de uma amostra reacional contendo CMC 1 % em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,2. Um volume de 0,5 mL da solução de CMC 1 % foi adicionado a 0,5 mL do extrato enzimático e então incubados em banho termostático a 45 ^{o}C por 30 minutos. Após a incubação a reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) e posterior banho fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo. Em todas as análises foram incluídos brancos enzimáticos. Os açúcares redutores liberados foram determinados a 540 nm em espectrofotômetro (Miller, 1959).

Uma unidade de atividade de CMC foi determinada como a capacidade da enzima em liberar 1 μmol de glicose por minuto a partir da CMC original nas condições do ensaio.

A solução DNS foi preparada com a adição de 1 g DNS em 20 mL NaOH 2 M, acrescido de 50 mL de tartarato duplo de sódio e potássio. Após a solução foi aquecida até 40 ^{o}C para a total dissolução da mistura e então completada para um volume final de 100 mL com água destilada. A curva padrão foi realizada através do protocolo descrito por Miller, (1959).

4.5.2. Atividade de celobiase

Para a atividade de celobiase foi realizada uma mistura reacional que continha 0,1 mL de solução de celobiose 20 mM em tampão acetato 0,2 M, pH 5,2 e 0,1 mL da solução enzimática.

Após essa mistura, a amostra foi incubada em banho termostático a 45 ^{o}C por 30 minutos e então incubada em banho fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo para que a reação fosse paralisada.

A quantificação da glicose formada foi determinada pelo kit da glicose-oxidase (Henry *et al.*, 1974). Uma unidade de atividade de celobiase foi definida como a capacidade da enzima em produzir 1 μmol de glicose por minuto a partir da celobiose original nas condições do ensaio.

4.5.3. Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase)

A quantificação da atividade FPásica foi realizada com o uso de papel de filtro Whatman N°. 1 (fonte de celulose) como substrato. Foram pesados 50 mg de papel filtro, cortado em tiras e adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 4,2. Foi adicionado um volume de 1 mL da solução enzimática ao tubo, incubados em banho termostático a 45 ^{o}C, por 1 hora. A amostra foi colocada em banho de ebulição por 5 minutos e depois em banho de gelo.

A quantificação dos açúcares redutores liberados foi medida utilizando a técnica com solução de DNS e leitura espectrofotométrica a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade de atividade de FPase foi determinada como a capacidade da enzima em liberar 1 μmol de glicose por minuto a partir do papel de filtro original.

4.6. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A preparação do reagente de Bradford foi realizada conforme Green e Sambrook, (2001), onde foi dissolvido 350 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 100 mL de etanol 95 %. Em seguida, foram adicionados 200 mL de ácido fosfórico 88 %. A solução, assim obtida, foi diluída para 300 mL com água deionizada e mantida em geladeira.

Para a montagem da curva de calibração foi utilizada uma solução de Albumina de Soro Bovino (BSA), Sigma (0,1 mg/mL). As absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se água como branco.

Para a determinação das proteínas foram adicionados 200 μL do reagente de Bradford em 800 μL do sobrenadante de cada amostra. Em seguida a absorbância foi medida e a concentração das proteínas foi determinada contra a curva de calibração, baseada em albumina de soro bovina como padrão.

4.7. Triagem de micro-organismos produtores de xilanases em meio sólido

Os micro-organismos produtores de xilanases foram selecionados devido à capacidade de degradação da xilana como única fonte de carbono, conforme Motta, (2008). O meio de cultivo utilizado para a triagem está listado na Tabela 5.

Tabela 5: Composição do meio sólido para triagem em placas de Petri

Composição do meio	**Concentrações (g/L)**
Xilana de *birchwood* (Sigma)	10
Extrato de levedura	0,6
KH_2PO_4	7,0
K_2HPO_4	2,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
Ágar	15,0
O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.	

Os micro-organismos foram inoculados no centro das placas de Petri, identificados conforme o código de cada micro-organismo e incubados em estufa a 30 ^{o}C em um período de 3 a 5 dias, para posterior revelação com vermelho de Congo.

As cepas que obtiveram crescimento no meio de triagem com xilana de *birchwood* foram reveladas com solução de vermelho de Congo 1,4 g/L, em tampão Tris-HCl 0,1 M com pH 8,0 por 30 minutos. Para finalizar, as amostras foram submetidas a solução NaCl 0,5 M por mais 30 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada. Quando ocorreu a hidrólise da xilana foi observado um halo descolorido ao redor da colônia. A formação desse halo descolorido segue a proposta de Anagnostakis e Hankin (1975) onde a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa o índice enzimático de atividade (IEA) conforme a equação:

$$IEA = \frac{diâmetro\ do\ halo\ descolorido\ (cm)}{diâmetro\ da\ colônia\ (cm)} \qquad \text{[eq. 01]}$$

As linhagens que apresentam halo de degradação ao redor da colônia são consideradas como potenciais produtoras de xilanases. Como micro-organismo de referência foi utilizado *Aureobasidium pullulans*, descrito na literatura como produtor de xilanase (Li e Ljungdahl, 1996; Ohta *et al.*, 2001).

4.8. Ensaios para seleção de micro-organismos fermentadores de xilose

4.8.1. Padronização do inóculo

Para a padronização do inóculo, as linhagens foram inoculadas (1 alçada) em 20 mL do meio nutriente descrito na tabela 6, em frascos Erlenmeyer de 125 mL e cultivadas a 28 ^{o}C por 24 h a 150 rpm. Com o meio fermentado foram feitas várias diluições e medidos os valores de absorbância em espectrofotômetro, cada diluição foi colocada em eppendorf de 1mL essas foram centrifugadas à 10000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado

com água destilada e novamente centrifugado, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi colocado na estufa por 24 h a 60°C depois foram pesados para determinação do peso seco. Foi construído um gráfico Abs a 600 nm x peso seco (mg/mL) e a equação de regressão foi obtida. Esta equação foi utilizada para a determinação do peso seco nos experimentos posteriores, a partir da medida da absorbância a 600 nm. Os inóculos foram padronizados em 1mg/mL para os testes de assimilação e 4 mg/mL para os testes de fermentação.

4.8.2. Avaliação da capacidade de assimilação de xilose

Os micro-organismos foram inoculados em um meio líquido (Tabela 6), contendo xilose como única fonte de carbono, conforme descrito por Carrion (2011).

Tabela 6: Composição do meio basal para assimilação de xilose

Composição do meio	Concentrações (g/L)
Xilose	10
KH_2PO_4	2,0
$MgSO_4.7H_2O$	1,0
$(NH_4)_2SO_4$	2,0
Uréia	0,3
$CaCl_2$	0,3

Foram inoculados 1 mg/mL de cada micro-organismo no meio contendo xilose para os testes de assimilação. O cultivo foi realizado a uma temperatura de 28 ^oC, por 96 h, sob agitação de 150 rpm e as amostras foram coletadas a cada 24 h para a avaliação do crescimento celular. O monitoramento do crescimento celular foi realizado por determinação da densidade óptica a 600 nm. Como branco foi utilizado um meio basal sem a presença de micro-organismos.

4.8.3. Teste para seleção de micro-organismos com potencial para produção de etanol

Os micro-organismos que apresentaram um melhor resultado para a assimilação de xilose foram utilizados para testes quanto a capacidade de produção de etanol, através da fermentação submersa, em meio basal contendo xilose (60,0 g/L) como única fonte de carbono e o inóculo padronizado para 4 mg/mL.

Para a realização do processo fermentativo foram utilizados tubos de vidro (20 mL) lacrados com tampas de borracha e uma agulha introduzida na tampa para saída de CO_2. O meio fermentativo (6 mL) foi mantido, dessa forma, em condições de semi-aerobiose, a 28 ^{o}C, sob agitação de 100 rpm e o pH foi ajustado para 5. Foram retiradas alíquotas em um período de 96 h, com posterior avaliação do consumo da xilose e produção de etanol.

4.8.4. Quantificação de etanol produzido e xilose consumida

A quantificação do consumo de xilose e do etanol produzido foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad), mantida a 60 ^{o}C. O eluente para a separação foi ácido sulfúrico 1 mM, aplicado a uma taxa de eluição 0,8 mL.min^{-1}. A coluna foi acoplada ao detector de índice de refração.

4.9. Identificação Molecular

4.9.1. Extração do DNA genômico

Os micro-organismos isolados foram cultivados em meio líquido 2% YEPD (*Yeast Extract Peptona Dextrose*), mantidos sob agitação (180 rpm) por 72 h a 28 ºC para proceder a extração de

DNA genômico. O micélio fúngico desenvolvido foi filtrado e macerado até a pulverização com a adição de nitrogênio líquido. Ao micélio pulverizado foram adicionados 0,75 mL de Tampão de Lise (0,6 M de NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 4 % de SDS) e 0,3 mL de fenol tamponado, pH 8,0 (na proporção de 1 mL para cada 0,1 g de micélio pulverizado). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase superior aquosa foi coletada, adicionada de 1 volume de solução fenol:clorofórmio (1:1), homogeneizada em vórtex por 10 minutos e centrifugada (10.000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi coletado e os ácidos nucléicos foram precipitados com adição de 300 mM de acetato de sódio (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto por 1 h, seguido de centrifugação. Os ácidos nucléicos foram ressuspendidos em 0,05 mL de água milli-Q e tratados com RNase (50 µg/mL). (Sambrook *et al.*, 2001). A integridade do DNA extraído de cada amostra foi verificada pela detecção de bandas de alto peso molecular em gel de agarose 0,8 %. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.9.2. Amplificação de DNA ribossomal e sequenciamento

Uma região do rDNA 18S foi amplificada por PCR com os iniciadores específicos para uma porção deste gene. A reação de PCR foi realizada com os seguintes componentes: DNA genômico diluído 1:50 (50 ng/µL), DMSO 5 %, 1 mM de cada dNTP, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores Euka F (5′-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′) e Euka R (5′-GATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3′) (Koid *et al*, 2012), 10x de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl), 50 mM $MgCl_2$ e 0,2 U/µL de Taq DNA polimerase (Promega) e água milli-Q para completar o volume de 25 µL.

A PCR foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1,30 min) e 72 °C de extensão final

por 7 min. A verificação dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1 %. Os fragmentos foram purificados utilizando 1 µg/µL de tRNA e 2,5 volumes de etanol absoluto incubados a -20º C "overnight". As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos, o *pellet* foi lavado com etanol 70 % e ressuspendido em água milli-Q. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 ºC até a realização da quantificação. A quantificação de DNA foi realizada por análise fluorométrica, utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia, UFRGS-RS, no sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), com o emprego dos mesmos iniciadores utilizados na amplificação dos respectivos fragmentos.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência obtidas EMBL/GenBank database, usando a ferramenta NCBI BLAST.

4.10. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os micro-organismos foram crescidos em meio contendo celulose e alíquotas foram retiradas, nos tempos onde foram descritos como os melhores para a atividade de CMCase. A eletroforese com agente desnaturante (SDS) foi realizada em gel de poliacrilamida a 12 %, para determinar o perfil das proteínas no complexo enzimático. Foram utilizados para a determinação três micro-organismos descritos como promissores produtores de celulases: TE13 (*Aspergillus* sp.), T8a (*Penicillium* sp.) e RR71 (*Trichosporon asteroides*), além do micro-organismo de referência *T. reesei*, utilizado nos testes de atividade enzimática.

Os géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Os

componentes acrílicos foram preparados segundo Laemmli (1970), em duas fases, chamada de sistema descontínuo, que consiste de gel concentrador (Tabela 7) e gel separador (Tabela 8).

Tabela 7: Gel concentrador.

Soluções	Volume
Água milli-Q	3,0 mL
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	0,65 mL
SDS 10 %	50 μL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 mL
TEMED	10 μL
APS 10 %	50 μL
Volume total para 5 mL	

Tabela 8: Gel separador

Soluções	Volume
Água milli-Q	3,4 mL
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	4 mL
SDS 10 %	100 μL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
TEMED	20 μL
APS 10 %	100 μL
Volume total para 10 mL	

Após a polimerização do gel, este foi colocado em tampão de corrida (Tabela 9). Por fim, as amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas colocando-as dentro de frascos eppendorf (7 mL de amostra) com tampão da amostra (Tabela 9) para a concentração final de 1x. Os volumes foram cuidadosamente injetados no gel de eletroforese e após a corrida eletroforética, o gel contendo as bandas de proteínas foi incubado por 16 horas a temperatura ambiente em 0,5 % de

Coomassie R-250 dissolvido em solução fixadora (50 % de metanol, 10 % de ácido acético e 40 % de água destilada). Após esse período de incubação na solução corante o gel foi descorado em 10 % de ácido acético.

Tabela 9: Tampão de corrida e tampão de amostra.

Tampão de corrida		Tampão de amostra (5X)	
Tris base	25 mM	Tris-HCI pH 6,8	62,5 mM
Glicina	0,192 mM	Glicerol	25 %
SDS	0,10 %	SDS	2,00 %
pH para 8,3		Azul de bromofenol	0,01 %

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Celulases

5.1.1. Atividade celulolítica em meio sólido

A primeira etapa de avaliação do potencial celulolítico foi realizada em meio sólido, contendo como única fonte de carbono a carboximetilcelulose (CMC). Em seguida, as placas de Petri foram reveladas com corante vermelho de Congo. Um painel de 180 leveduras foi testado e apenas quatro delas foram selecionadas para estudos posteriores. Para os isolados de solo de alambique, 10 foram selecionadas de um total de 57 testadas. Foram utilizados como linhagens de referências os micro-organismos *T. reesei* e *A. strictum*, ambos descritos na literatura como bons produtores de CMCases (Payne *et al.*, 2015; Goldbeck *et al.*, 2013).

A medida dos diâmetros dos halos de hidrólise que foram observados nas leveduras coradas com o corante vermelho de Congo representa uma informação diretamente relacionada à região de atuação das enzimas celulolíticas, visto que este corante permanece ligado apenas às regiões onde há ligações *β*-1,4-glicosídicas (Goldbeck *et al.*, 2012) (Figura 12).

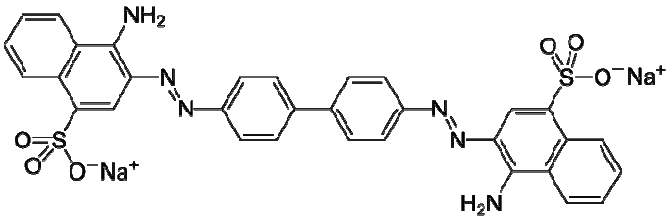

Figura 12: Estrutura do corante vermelho do Congo.

Essa formação de halos em meio sólido é resultado da quebra da CMC em fragmentos menores nos quais o vermelho de Congo não se adsorve. Dessa forma, quando as placas são lavadas

com solução de NaCl, o corante vermelho de Congo é removido das regiões onde houve a degradação da celulose. Embora essa técnica seja muito utilizada para triagem de subtratos solúveis em meio sólido, ela não é adequada para triagens sobre substratos insolúveis. Estes necessitam de outros testes para a avaliação geralmente conduzidas em meio líquido.

A título de demonstração, na Figura 13 são mostradas algumas placas com resultados positivos para produção de CMCase, crescidas em placas de Petri e coradas com vermelho de Congo, após 4 dias de incubação à 30 ºC em estufa.

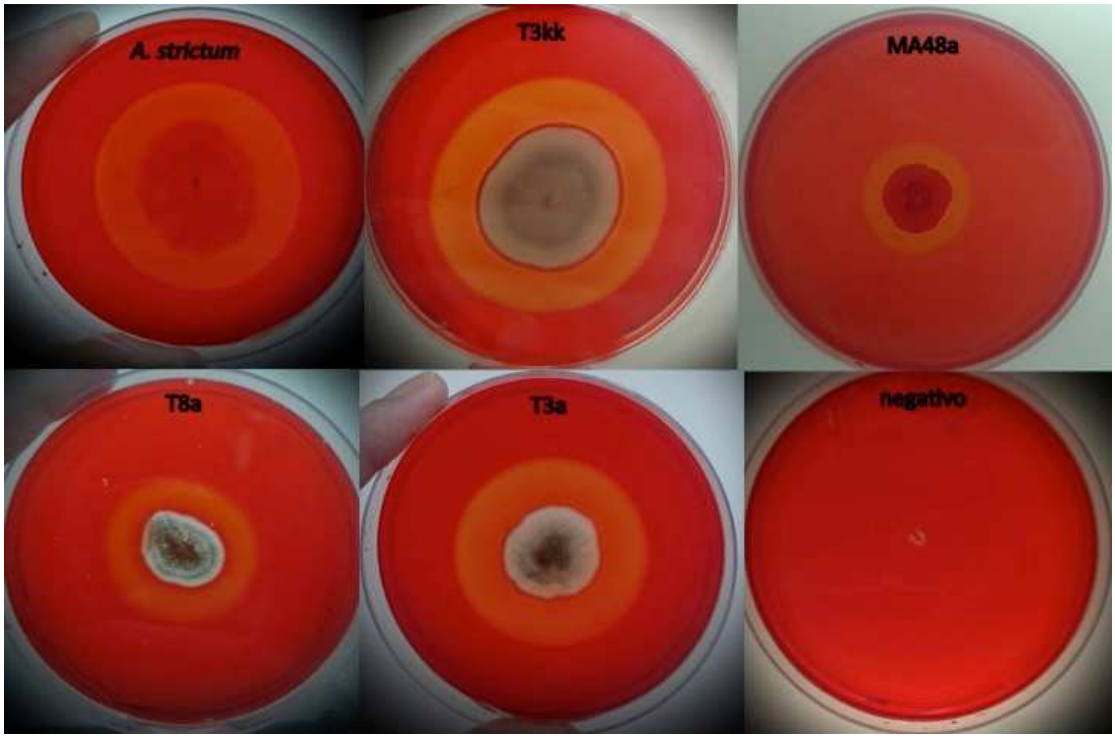

Figura 13: Avaliação qualitativa da atividade de CMCase através da formação dos halos descoloridos ao redor da colônia dos micro-organismos após coloração com o vermelho de Congo.

O índice enzimático de atividade (IEA) foi determinado pela relação entre o diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia e permitiu verificar as linhagens de leveduras e isolados de solo de alambique que se destacaram como produtoras de CMCases (Tabela 10).

Tabela 10: Médias dos índices enzimáticos de atividade (IEA) das CMCases dos micro-organismos cultivados em meio sólido.

Micro-organismo	IEA (média)	Origem
A. strictum	1,4	controle
T3AB	1,9	solo de alambique
T3AC	2,04	solo de alambique
T2HA	1,3	solo de alambique
T2HB	1,44	solo de alambique
TE13	1,37	solo de alambique
TE11	1,08	solo de alambique
T8A	1,26	solo de alambique
T2HH	1,38	solo de alambique
T2AA	1,3	solo de alambique
T3LL	2,05	solo de alambique
EP7C	1,32	madeireira
RR71	2,84	floresta Amazônica - RR
MA48A	1,27	madeireira
MA43A	0,9	madeireira

De acordo com Ten *et al.* (2004), o diâmetro do halo descolorido é importante e útil por permitir a seleção de linhagens com altos níveis de atividade de hidrólise. Além disso, a técnica permite que o índice enzimático possa ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial para a produção de enzimas celulolíticas tanto de um grupo dentro da mesma espécie, quanto de espécies diferentes. Dessa forma, as linhagens de micro-organismos que produziram atividades enzimáticas foram, em seguida, testadas quanto à produção de celulases em meio líquido.

5.1.2. Atividade enzimática em meio líquido

Depois de verificado o potencial celulolítico dos micro-organismos em placa de Petri, foi

iniciada a segunda etapa, com o objetivo de avaliar quantitativamente o potencial de cada um dos micro-organismos selecionados. Para tal, os microrganismos foram inoculados em meio líquido contendo meio nutriente e celulose como única fonte de carbono, simulando, dessa maneira, um processo de fermentação líquida com substrato insolúvel.

Para a verificação da capacidade hidrolítica de cada enzima foram realizados três diferentes experimentos de atividade enzimática. O teste de CMCase foi empregado para quantificar apenas as endoglucanases. O teste de celobiase foi utilizado para quantificar especificamente enzimas capazes de clivar celobiose e liberar glicose. Já, o teste de FPase foi empregado para determinar todas as celulases produzidas no meio. Os açúcares redutores liberados nas reações foram medidos pelo método DNS e a glicose liberada foi medida pelo uso do kit glicose-oxidase (Dashtban *et al.*, 2010).

A determinação de açúcares redutores pelo método do DNS baseia-se na redução, em meio alcalino, do ácido 3,5-dinitrossalicílico, que possui coloração amarela. O produto formado quando o DNS reage com açúcares redutores (que possuem a função aldeído) é um composto estável de coloração laranja-avermelhado, o ácido 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzóico. Neste método ocorre uma reação redox, conforme Figura 14.

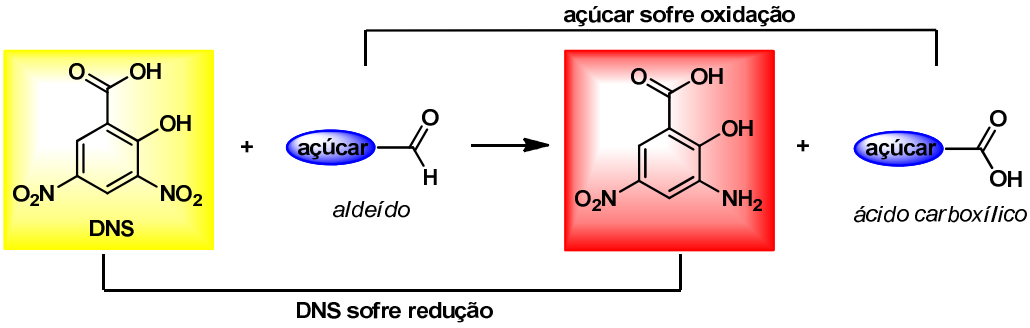

Figura 14: Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS.

Para os testes com CMCase percebeu-se atividades bem distintas entre as leveduras e os micro-organismos de referência.

A levedura que apresentou uma maior atividade nas condições de ensaio foi a RR71, com valor de 0,06 U.mL^{-1} após 360 h (Figura 15 e Tabela 11 - Anexo). No entanto esse resultado ainda é bastante inferior quando observado aos micro-organismos de referência onde os valores máximos para *A. strictum* foi de 0,193 U.mL^{-1} em 312 h e para *T. reesei* 0,256 U.mL^{-1} em 360 h. Nos resultados obtidos destacou-se o fato das linhagens Ma43a e Ma48a apresentarem baixos valores para a atividade de CMCase, o que contrasta com os resultados dos ensaios em placas de Petri coradas com vermelho de Congo.

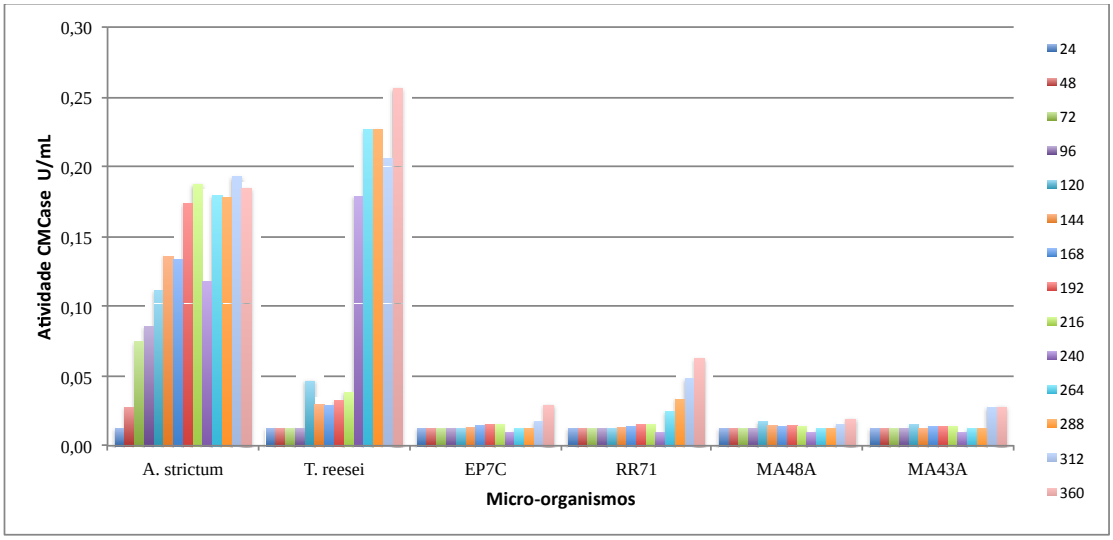

Figura 15: Avaliação da atividade de CMCase em leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

Na literatura, as atividades enzimáticas de leveduras também se mostram reduzidas quando comparadas a fungos filamentosos. Porém, o que se pode ressaltar é o fato da existência de linhagens de leveduras que, sob determinadas condições, são capazes de produzir enzimas de grande interesse biotecnológico, como as celulases. Peixoto (2006) selecionou leveduras silvestres de diversas regiões brasileiras com potencial para produção de celulases onde, a levedura chamada AQ6 apresentou atividade de 0,164 U.mL^{-1} e a levedura chamada AS03 apresentou atividade de 0,139 U.mL^{-1}. Comparando os resultados obtidos por Peixoto, pode-se verificar que os resultados

obtidos nesse trabalho são inferiores.

Por outro lado, os isolados de solo de alambique mostraram resultados satisfatórios para atividade de CMCase.

Pela analise da Figura 16 (Tabela 12 - Anexo) pode-se observar que os isolados de solo de alambique que se destacaram na produção de CMCase foram o TE13 e o T8a, quando comparados aos micro-organismos de referência.

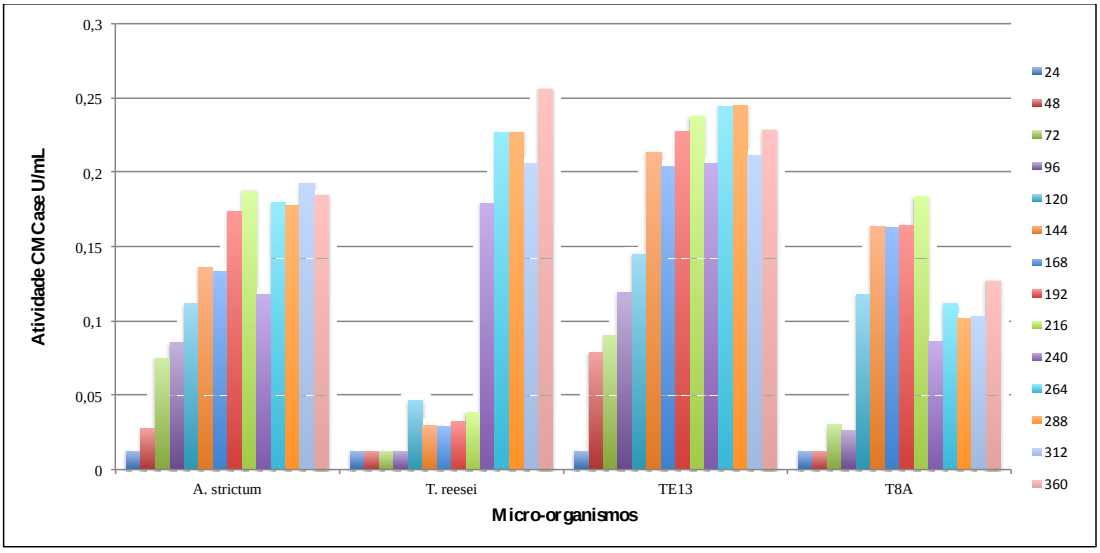

Figura 16: Avaliação da atividade de CMCase para os isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

Os resultados, quando comparados aos micro-organismos de referência, mostram que o melhor desempenho foi apresentado pelo TE13, que teve uma atividade de 0,245 $U.mL^{-1}$ em 264 h, superior ao *A. strictum*, que apresentou uma atividade de 0,193 $U.mL^{-1}$ em 312 h. Quando compara-se o TE13 com o fungo *T. reesei*, que é conhecido como o organismo que melhor atua na degradação de sistemas celulósicos, os valores máximos de atividade enzimática se mostraram muito semelhantes (0,245 $U.mL^{-1}$ em 264 h e 0,256 $U.mL^{-1}$ em 360 h, respectivamente). Entretanto, pode-se observar através da análise da Figura 16, que o isolado TE13 após 144 h mostrou uma significativa produção de celulases, resultado bem superior ao *T. reesei* que só apresenta níveis comparáveis de atividade após 244 h de incubação. O micro-organismo T8a apresentou atividade

enzimática de 0,184 U/mL^{-1} em 216 h, com valores comparáveis ao *A. strictum*, mas quando comparado ao *T. reesei* a atividade enzimática mostrou valores inferiores.

Florencio (2011) utilizou em seus estudos *T. reesei* RUT C30 como linhagem de referência e observou uma atividade enzimática de 0,30 UI.mL^{-1}, enquanto que Goldbeck *et al*. (2013), obteve uma atividade de 0,07 U.mL^{-1} para *A. strictum*. Com isso pode-se dizer que os valores obtidos com as linhagens de referência estão de acordo ou superior com os descritos pelos autores.

Para a quantificação enzimática da celobiase, as leveduras testadas não produziram atividade enzimática, sendo os resultados de absorbância negativos. Para os isolados de solo de alambique, apenas a TE13 apresentou atividade de celobiase com valor máximo de 0,238 U.mL^{-1} em 264 h (Figura 17). As linhagens utilizadas como referência apresentaram valores de 0,055 U.mL^{-1} para *A. strictum* em 264 h e 0,043 U.mL^{-1} em 216 h para *T. reesei*. Goldbeck *et al.* (2013) obteve uma atividade de celobiase de 0,0125 U.ml^{-1} para *A. strictum* em 96 h, utilizando a mesma celulose deste estudo. Nos testes de atividade de celobiase observou-se que tempos mais prolongados aumentaram a produção de enzimas para o isolado TE13. Com isso, o TE13 apresenta-se como promissor candidato para produção de celobiases.

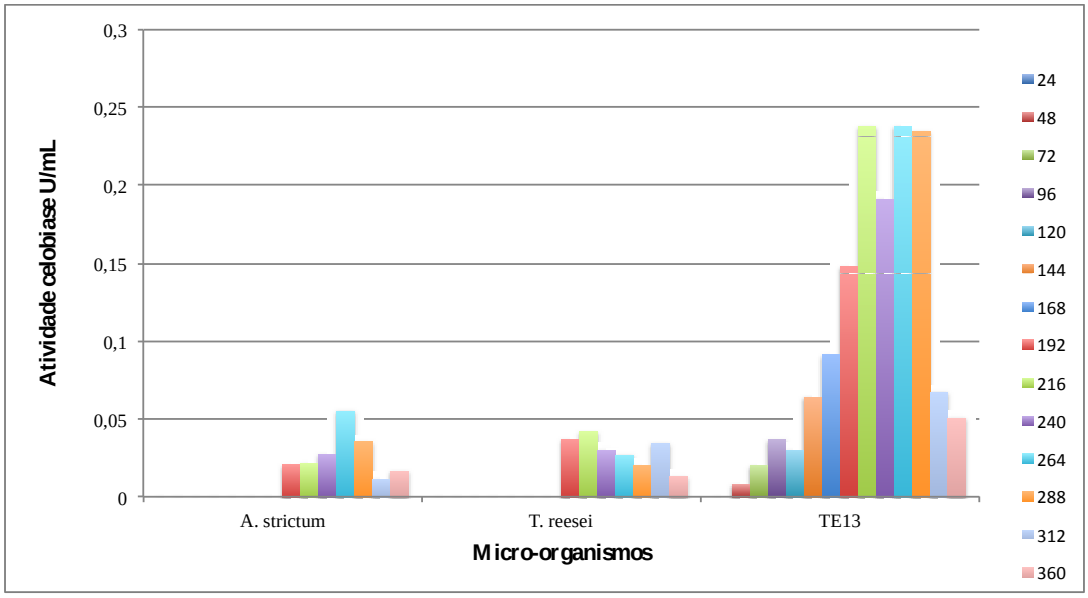

Figura 17: Avaliação da atividade de celobiase para o isolado de solo de alambique TE13 em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

Por fim, realizou-se o teste de degradação em papel filtro para a quantificação das celulases totais através do experimento de atividade de FPase. Para nenhuma das leveduras e isolados de solo de alambique testados houve degradação do papel filtro. Esses resultados sugerem que os micro-organismos selecionados são produtores de endoglucanases, mas não são capazes de degradar um complexo altamente organizado como tiras de papéis. É conhecido que a CMC é um polímero com alto grau de polimerização e baixa cristalinidade, consequentemente é mais acessível para a ação de endoglucanases. Para as cepas de referência os valores obtidos foram semelhantes aos relatados na literatura de 0,045 $U.mL^{-1}$ para *A. strictum* e 0,035 $U.mL^{-1}$ para *T. reesei.*

Para Peixoto (2006), as leveduras AP2, AQ3 e AY7 produziram maior atividade de FPase entre as linhagens testadas (0,034 $U.mL^{-1}$, 0,038 $U.mL^{-1}$ e 0,041 $U.mL^{-1}$, respectivamente) após 120 h de fermentação em frascos agitados a 150 rpm e 30 °C. Segundo o autor o teste de atividade de FPase revela que tempos menores de fermentação promovem a produção do complexo celulase com maior atividade.

A produção de enzimas do complexo celulolítico não está somente ligada à linhagens dos micro-organismos mas, principalmente, pelas técnicas e substratos utilizados nos processos e isso torna difícil a comparação de resultados com estudos realizados por outros autores.

De maneira geral, as atividades enzimáticas reveladas nesse estudo para leveduras, ainda são reduzidas em comparação com micro-organismos, em especial fungos filamentosos. O que se pode ressaltar ainda é o fato da existência de linhagens de leveduras que, sob determinadas condições, produzem enzimas de interesse biotecnológico e, ainda, devem ser alvo de estudos mais detalhados.

5.1.3. Determinação das proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada para os micro-organismos que apresentaram melhor desempenho na hidrólise da celulose, segundo o método de Bradford (1976). O método de Bradford

utiliza o corante “Comassie Brilhant Blue” BG-250 (Figura 18) para a determinação das proteínas totais. Esse corante interage com as proteínas que contém aminoácidos com cadeias laterais aromáticas ou básicas. Durante a reação, ocorre a interação entre a proteína e o corante BG-250, com alteração do pH, que provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente a 595 nm.

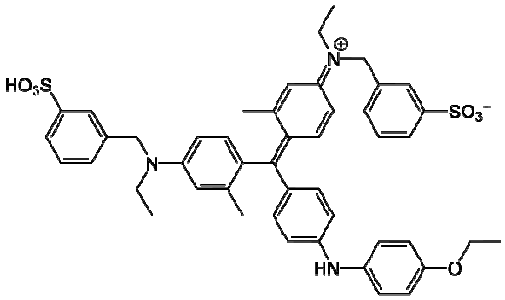

Figura 18: Estrutura do corante “Comassie Brilhant Blue” BG-250.

A concentração das proteínas totais no sobrenadante das culturas dos isolados de solo de alambique TE13 e T8a mostraram-se inferiores quando comparados aos micro-organismos de referência. Entretanto, observa-se que a secreção de proteínas totais manteve-se essencialmente constante ao longo do tempo (Figura 19).

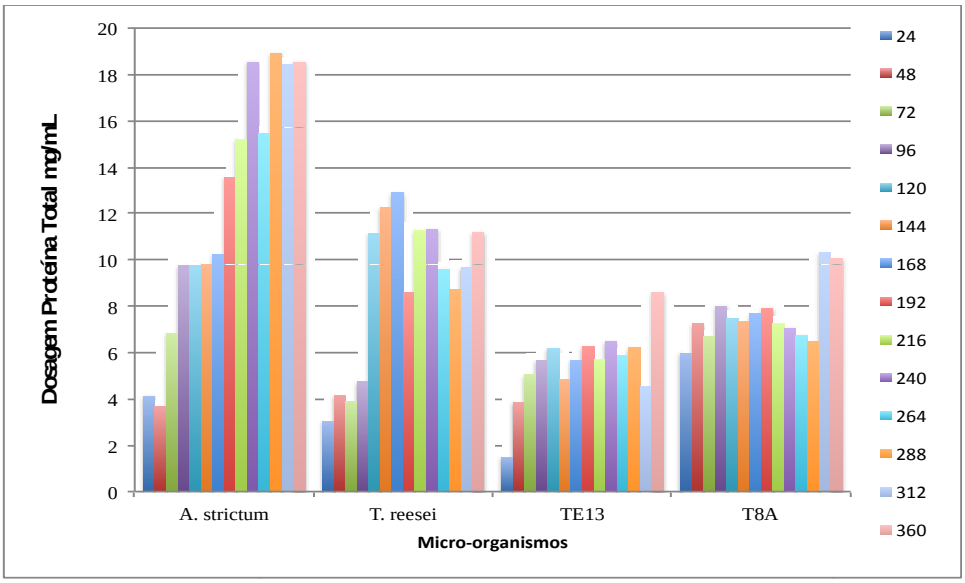

Figura 19: Avaliação da dosagem de proteínas totais de isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

As leveduras estudadas também apresentaram resultados inferiores quanto à secreção de proteínas totais, quando comparadas com *A. strictum* e *T. reesei*. A levedura Ep7c demonstrou um valor elevado de produção de proteínas nos tempos de 96 e 120 h, caindo drasticamente após esse período. Para RR71 a maior produção de proteínas foi nas primeiras 24 h, depois disso os valores se mantiveram baixos. A MA48a e MA43a não apresentaram valores com significativas diferenças ao longo do tempo (Figura 20). Pode-se perceber com isso, que os micro-organismos de referência produziram mais proteínas totais que os micro-organismos avaliados.

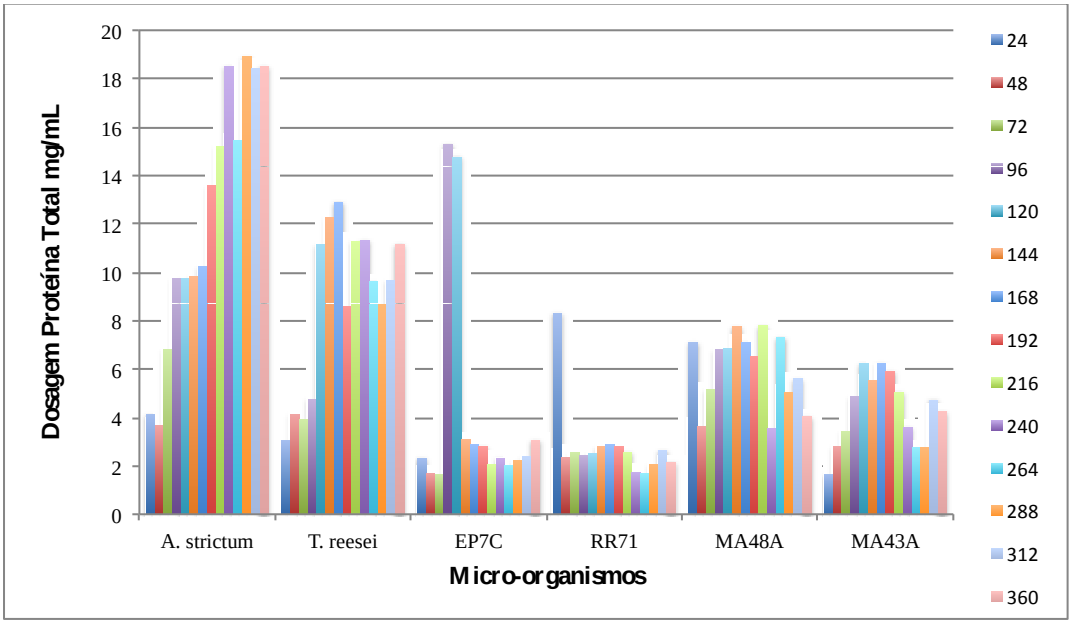

Figura 20: Avaliação da dosagem de proteínas totais para as leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

5.1.4. Determinação da atividade específica das CMCases

Os cálculos de atividade específica das CMCases foram feitos através da razão da atividade enzimática da CMCase (U/mL) pela atividade da proteína total (mg/mL). Para as leveduras testadas a atividade enzimática específica da CMCase apresentou valores significativamente maiores quando comparados com as linhagens de referência (Figura 21). Isso sugere que as leveduras testadas

produzem uma maior proporção de enzimas CMCases em relação às demais proteínas. Já os micro-organismos de referência, além de CMCases secretam também, em grande proporção, outras proteínas/enzimas.

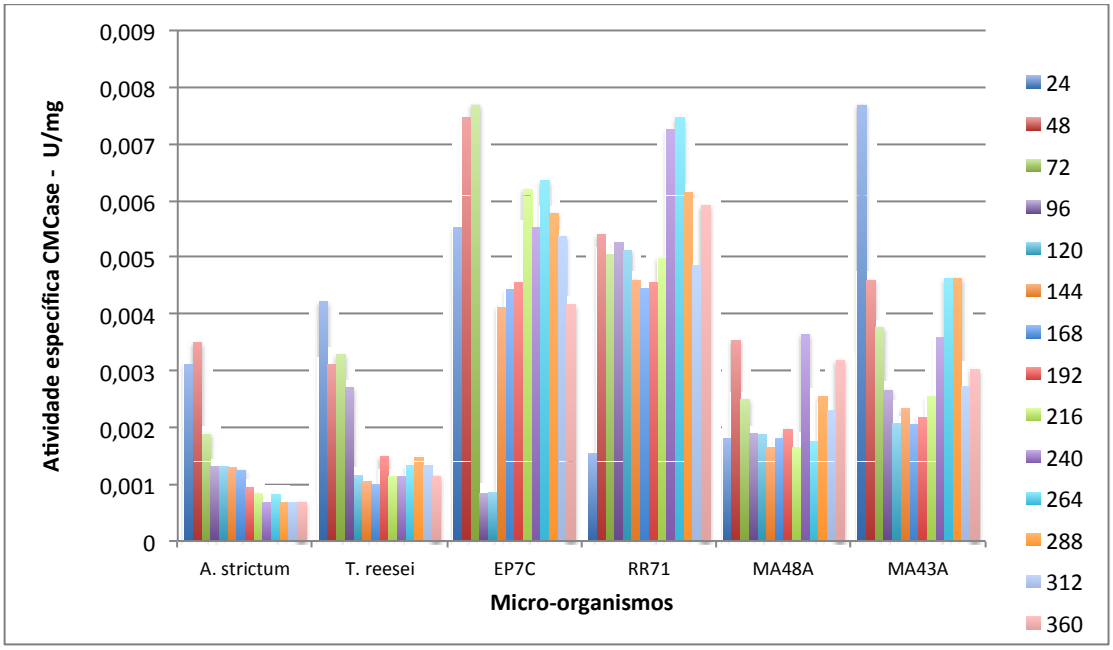

Figura 21: Avaliação da atividade específica de CMCase para leveduras em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

Os isolados de solo de alambique TE13 e T8A também apresentaram, de modo geral, atividades específicas maiores do que os micro-organismos de referência (Figura 22). Esses resultados sugerem que os isolados de solo de alambique possuem uma menor produção de proteínas, quando comparados aos de referência. Entretanto, quando analisada a atividade específica de CMCase, pode-se observar que há uma produção de CMCase em maior proporção para TE13 e T8a em relação às demais enzimas. Por outro lado, os micro-organismos de referência secretaram uma grande concentração de proteínas, mas com uma proporção menor de CMCases.

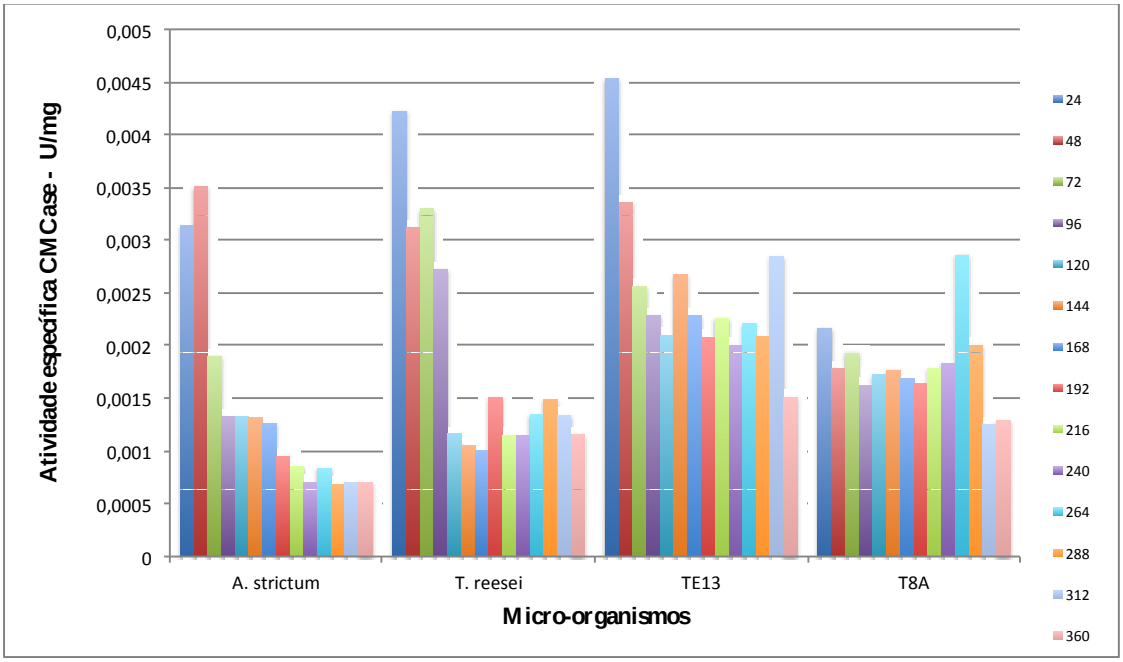

Figura 22: Avaliação da atividade específica de CMCase para os isolados de solo de alambique em comparação com as linhagens de referência *A. strictum* e *T. reesei*.

5.2. Xilanases

5.2.1. Triagem de leveduras produtoras de xilanases em meio sólido

Em seguida, a coleção de leveduras e isolados de solo de alambique foi avaliada frente à sua capacidade de produção de xilanases. A análise da atividade de hidrólise da xilana foi feita em meio sólido contendo xilana de Birchwood como única fonte de carbono e coradas com solução de vermelho de Congo. Nenhum dos vários micro-organismos testados apresentou resultados satisfatórios, pois não houve formação de halo descolorido ao redor da colônia, ocorrendo apenas o crescimento do micro-organismo. Para o micro-organismo de referência *A. pullulans* ocorreu formação de um pequeno halo descolorido, sinalizando atividade de hidrólise em meio contendo xilana. Nas mesmas condições empregadas nesse estudo, Motta (2008) selecionou 84 das 349 leveduras silvestres utilizadas na sua triagem e dessas 84 cepas 37 foram selecionadas por possuir IAE 2,5 vezes maior que o diâmetro da colônia, indicando assim uma alta capacidade de produção

de xilanase ou que a enzima produzida possui alta atividade.

Diante dos resultados negativos para atividade xilanolítica em meio sólido, não foram realizados estudos de atividade em meio líquido, pois a triagem inicial mostrou que os micro-organismos não foram capazes de degradar a xilana.

5.3. Fermentação da xilose

5.3.1. Avaliação da capacidade de assimilação de xilose

Antes da avaliação dos micro-organismos para fermentação de xilose e produção de etanol, estes foram testados quanto a capacidade de assimilação de xilose por um período de até 96 h. Para tanto, acompanhou-se a evolução do crescimento celular por medidas de absorbância (DO 600nm) em intervalos de tempo de 24 h. Os micro-organismos que apresentaram valores de densidade ótica (DO) superior a 4, foram selecionados para os testes de fermentação. Dos 237 micro-organismos testados, 70 foram selecionados por apresentarem crescimento em meio contendo xilose com DO superior a 4 no caso de leveduras ou crescimento filamentoso (Tabela 13).

Tabela 13: Micro-organismos selecionadas por apresentarem crescimento em meio contendo xilose, com DO superior a 4 ou crescimento filamentoso.

Micro-organismo	DO (600nm)	Micro-organismo	DO (600nm)
VR52	4,9	Ma65d	4,4
VR19	6,7	Ma62d	6,7
TE13	cf*	Ma49b	5,6
TE11	cf*	Ma49a	7,6
T8a	cf*	Ma47a	4,2
T3LL	cf*	Ma45a	5,6
T3AC	cf*	Ma41b	6,3
T3AB	cf*	Ma30a	6,2
T2HH	cf*	Ma28b	4,5

Cont. Tabela 13

Micro-organismo	DO (600nm)	Micro-organismo	DO (600nm)
T2HB	cf*	Ma27a	4,8
T2HA	cf*	Ma26a	5,9
T2AA	cf*	Ma24b	7,8
RR84	5,1	Ma23d	5,6
RR74	4,9	Ma23a	4,215
RR50	7,3	Ep9c	4,03
RR49	7,1	Ep9b	5,35
RR48	5,6	Ep9a	5,63
RR44	5,5	Ep8c	5,4
RR278	8,2	Ep7c	4,98
RR267	4,3	Ep6b	4,79
RR244	6,9	Ep5b	4,24
RR233	6,1	Ep4c	4,625
RR230	4,4	Ep1a	4,28
RR23	4,5	Ep15d	4,75
RR22	6,46	Ep15b	4,88
RR217	6,11	Ep13b	9,0
RR200	8,23	Ep11a	7,5
RR146	8,48	51a	4,58
RR142	6,55	48d	7,03
RR120	8,19	39b	5,205
RR118a	7,1	37a	6,14
QU20	2,565	11CE	5,48
P. stipitis	4,44	11C	8,98
P. hubeiensis	4,855	10CE	6,82
Ma70b	6,22	34	5,03

cf* - crescimento filamentoso

5.3.2. Quantificação de etanol na fermentação da xilose

Após a avaliação do crescimento celular em meio contendo xilose, foram iniciados os testes de fermentação da xilose para aqueles micro-organismos que apresentaram DO maior que 4. Para

esse estudo foram utilizadas concentrações de xilose de 60 g/L. O método analítico utilizado para quantificar a eficiência na fermentação da xilose foi a determinação da quantidade de etanol produzido através de CLAE. Foram realizadas coletas de amostras no tempo de 96 h (Tabela 14).

Tabela 14: Micro-organismos submetidos a fermentação para produção de etanol.

Micro-organismo	**DO**	**Produção EtOH g/L**	**Xilose remanescente g/L**	**Micro-organismo**	**DO**	**Produção EtOH g/L**	**Xilose remanescente g/L**
VR52	4,9	0,173	0,00158	Ma49b	5,665	0,102	0,00134
VR19	6,75	0,099	0,00128	Ma49a	7,66	0,105	0,00256
TE13	cf*	0,062	0,00000	Ma47a	4,18	0,093	0,0009
TE11	cf*	0,071	0,00090	Ma45a	5,66	0,057	0,001
T8a	cf*	0,063	0,000	Ma41b	6,33	0,076	0,00176
T3LL	cf*	0,069	0,00105	Ma30a	6,18	0,080	0,00198
T3AB	cf*	0,059	0,00111	Ma28b	4,5	0,080	0,00065
T2HH	cf*	0,506	0,00181	Ma27a	4,795	0,1	0,00092
T2HA	cf*	0,365	0,00221	Ma26a	5,96	0,098	0,00113
RR84	5,1	0,101	0,00208	Ma24b	7,88	0,087	0,00155
RR74	4,89	0,101	0,00179	Ma23d	5,595	0,052	0,00177
RR50	7,27	0,104	0,00188	Ma23a	4,215	0,099	0,00164
RR49	7,16	0,100	0,00200	Ep9c	4,03	0,045	0,00087
RR48	5,61	0,090	0,00203	Ep9b	5,35	0,97	0,0009
RR44	5,52	0,073	0,00166	Ep9a	5,63	0,107	0,00149
RR278	8,26	0,113	0,000	Ep8c	5,4	0,1	0,00157
RR267	4,32	0,048	0,000	Ep7c	4,98	0,225	0,00159
RR244	6,94	0,059	0,00165	Ep6b	4,79	0,09	0,001
RR233	6,16	0,159	0,000	Ep5b	4,24	0,068	0,0018
RR230	4,47	0,067	0,0007	Ep4c	4,625	0,090	0,00238
RR23	4,53	0,088	0,000	Ep1a	4,28	0,080	0,001
RR22	6,46	0,064	0,00105	Ep15d	4,75	0,077	0,00113
RR217	6,11	0,080	0,000	Ep15b	4,88	0,069	0,00134
RR200	8,23	0,090	0,000	Ep13b	9	0,087	0,000
RR146	8,48	0,101	0,000	Ep11a	7,5	0,12	0,00107
RR142	6,55	0,099	0,0007	51a	4,58	0,100	0
RR120	8,19	0,097	0,0009	48d	7,03	0,09	0,00067
RR118a	7,1	0,109	0,000	39b	5,205	0,087	0,001
QU20	2,57	0,074	0,00246	37a	6,14	0,05	0,0005

Cont. Tabela 14

Micro-organismo	DO	Produção EtOH g/L	Xilose remanescente g/L	Micro-organismo	DO	Produção EtOH g/L	Xilose remanescente g/L
P. stipitis	4,44	4,008	0,00239	11CE	5,48	0,118	0
P. hubeiensis	4,86	0,076	0,00180	11C	8,98	0,007	0,00035
Ma70b	6,22	0,078	0,00105	10CE	6,82	0,107	0
Ma65d	4,42	0,077	0,00112	34	5,03	0,103	0
Ma62d	6,76	0,09	0,00127				

cf* - crescimento filamentoso

A Tabela 15 exibe as concentrações de xilose e etanol, após o período de 96 h, para as linhagens que obtiveram melhor produção de etanol (g/L). O micro-organismo de referência utilizado nessa etapa do trabalho foi *P. stipitis*, descrito na literatura pela capacidade de fermentar pentoses (Gírio *et al.*, 2010).

Tabela 15: Concentração de etanol produzido e xilose consumida após 96 h.

Micro-organismo	Produção de EtOH (g/L)	Consumo de Xilose (g/L)
P. stipitis	4,008	0,00239
T2HH	0,506	0,00181
T2HA	0,365	0,00221
Ep7c	0,225	0,00159

Conforme observado na Tabela 15, dentre os micro-organismos testados, o isolado T2HH apresentou os melhores resultados para produção de etanol (g/L), seguida por T2HA e Ep7c. No entanto, esses valores ainda são muito inferiores quando comparados com a levedura *P. stipitis*.

Quando se avalia o consumo de xilose (g/L) do meio de fermentação pode-se observar que os micro-organismos tiveram um alto consumo da xilose presente no meio. Isso não reflete a produção de etanol, que apresentou valores baixos quando comparados com o controle e com a literatura. O alto consumo de xilose e a baixa produção de etanol sugere que os micro-organismos

utilizaram a xilose para a produção de biomassa resultando em uma conversão incompleta para etanol. Para Gírio *et al.* (2010) na maioria dos casos, as leveduras assimiladoras de pentoses convertem a xilose em xilitol que pode ser um potencial inibidor da produção de etanol, devido a um possível desequilíbrio redox pela falta de oxigênio no meio.

Garcia (2012) utilizou como meio de fermentação hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de malte utilizando *P. stipitis* e obteve uma concentração de etanol de 10,7 g/L.

Em três leveduras testadas, Carrion (2011) obteve uma produção media de 5,1 g/L de etanol ao final de 120 h. Para o tempo de 96 h, uma produção máxima de 4,6 g/L de etanol é descrita, utilizando a levedura *Candida tropicalis*. Para todas as leveduras testadas o autor relata que, o consumo de xilose foi semelhante ao final de 120 h de fermentação, consumindo 99% da xilose presente no meio.

Cadete *et al*. (2012) obtiveram a partir de isolados ambientais cepas com alta capacidade de fermentação por D-xilose. Os autores mencionam como melhor resultado, em relação ao curto período de tempo da fermentação, a levedura *Spathaspora passalidarum* que produziu de 15 g/L a 18 g/L de etanol em 24 h.

Fujita (2010) obteve a concentração máxima de etanol de 1,34 g/L em meio sintético contendo 17 g/L de xilose, usando uma levedura isolada da natureza.

Essas variações na produção mostraram que são necessários mais experimentos para se obter uma melhor produção de EtOH no nosso sistema.

5.4. Identificação molecular dos micro-organismos selecionados

Após os testes prévios citados, os dois micro-organismos descritos como promissores produtores de celulases foram identificados por técnicas moleculares. A análise da sequência parcial

do gene 18S rDNA mostrou que o isolado T8a pertence ao gênero *Penicillium*, enquanto o TE13 pertence ao gênero *Aspergillus*, conforme mostrado na Tabela 16.

Tabela 16: Identificação molecular dos micro-organismos selecionados como potenciais produtores de celulases.

Isolado	Identificação Molecular	Identidade (%)
T8a	*Penicillium* sp.	95
TE13	*Aspergillus* sp.	99

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são relatados na literatura como fungos filamentosos com grande capacidade de hidrolisar sistemas celulósicos de maneira eficiente (Picart *et al.*, 2007). Sendo assim, esses micro-organismos são propostos como alternativas interessantes na busca por novas preparações comerciais, visando processos que apresentem maior eficiência na hidrólise de substratos celulósicos.

5.5. Caracterização de componentes proteicos por SDS-PAGE

A eletroforese em gel desnaturante é uma ferramenta muito utilizada para caracterização de componentes proteicos e detecção de proteínas, após separação do polipeptídeo desnaturado. Entre as principais vantagens desse método se inclui a identificação de proteínas particulares na mistura, a rápida estimativa da massa molecular da enzima e uma medida semi-quantitativa de isoenzimas específicas (Lacks e Springhorn, 1980). O uso de técnicas eletroforéticas como o SDS-PAGE pode ser mais um recurso no estudo da variabilidade em fungos, sendo utilizado para a separação de enzimas e outras proteínas e permitindo análises qualitativas e quantitativas.

Nesse contexto, as proteínas secretadas pelos três micro-organismos que apresentaram melhores atividades celulásicas foram caracterizadas. Para tanto, os micro-organismos foram cultivados em meio contendo celulose e alíquotas foram retiradas, nos tempos onde foram descritos como os melhores para a atividade de CMCase. A análise do gel, a partir do caldo enzimático de

TE13, T8a e RR71, mostraram a presença de inúmeras bandas de proteínas (Figura 23).

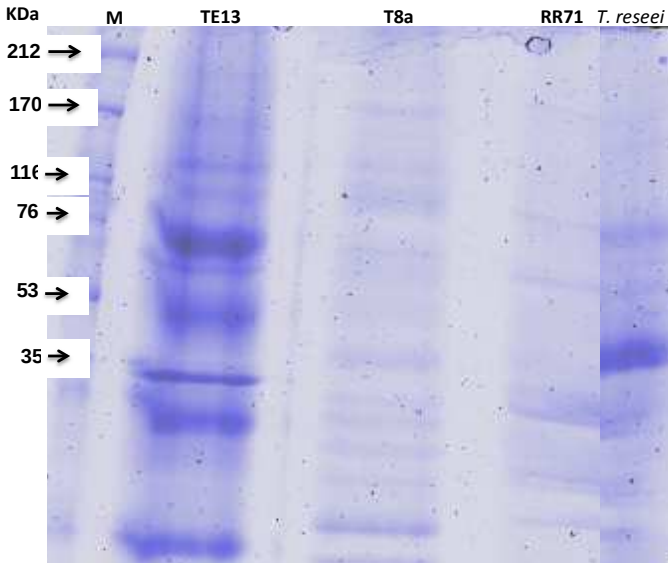

Figura 23: Análise das proteínas totais secretadas do sobrenadante dos cultivos utilizados para precipitação das proteínas com TCA por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE).

O micro-organismo TE13, identificado como *Aspergillus* sp., apresentou muitas bandas com coloração bem acentuada, com massas aproximados de 10, 20, 30, 50 e 70 KDa. Jabasingh *et al.* (2014) obteve celulases purificadas a partir da cultura de *Aspergillus nidulans* AJSU04. Estas celulases, quando aplicadas em gel de poliacrilamida, mostraram massas moleculares estimados em cerca de 57, 32 e 23 KDa, correspondendo a exoglucanase, endoglucanase e celobiase, respectivamente. Da mesma forma, Devi *et al.* (2012) observaram em análise por SDS-PAGE, com purificação parcial de celulases, duas bandas de proteínas com massa molecular de 33 e 24 KDa em *Aspergillus niger*.

As linhagens de *Aspergillus niger* têm sido estudadas devido à sua capacidade de produzir elevados níveis de *β*-glicosidase (TSAO *et al*., 2000).

Comparando-se os dados da literatura com os resultados obtidos, tanto nos ensaios de hidrólise quanto no SDS-PAGE, pode-se sugerir que o micro-organismo TE13 é capaz de produzir

endoglucanases e celobiases, mas não é capaz de produzir exoglucanases. Sem a ação das exoglucanases não ocorreria a hidrólise primária da fibra dificultando ou impossibilitando a ação das demais enzimas.

Para o micro-organismo T8a, identificado como *Penicillium* sp., observa-se várias bandas de baixa intensidade e de massas moleculares bastante variados. Zampieri (2011) utilizando amostras de *Penicillium echinulatum*, obtidos a partir de cultivo contendo celulose, obteve bandas equivalentes a 233 e 71 KDa. Já Picart *et al.* (2007), obtiveram a partir de extratos concentrados, que exibiram atividade de CMCase, faixas de massa molecular de 35 e 71 KDa para *Penicillium* sp. CR-316.

A linhagem do micro-organismo RR71, identificada como *Trichosporon asteróides*, mostrou baixa intensidade nas bandas, com leve preferência para uma proteína com massa molecular aproximada de 30 KDa. Esse resultado está em concordância com o descrito por Korish (2003), que realizou análise em gel de poliacrilamida de *Trichosporon* sp. sob condições não desnaturantes para a determinação de celulase purificada. O resultado obtido exibiu uma proteína com massa molecular aparente de cerca de 30 kDa.

O fungo *T. reesei* apresentou produção de proteínas em maior concentração com massas moleculares na faixa de 70 e 35 KDa. Zhou *et al*. (2008) estudaram a identificação e a purificação dos componentes principais de celulases de uma linhagem mutante de *Trichoderma viride* e encontraram uma grande amplitude de variação de massas moleculares, dentre eles exoglucanases com pesos de 67, 45 e 56 KDa além de uma celobiase de 110.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Este trabalho visou avaliar e selecionar micro-organismos com capacidade de produção de enzimas do complexo celulolítico e a capacidade dos micro-organismos para a produção de etanol. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Dos 237 micro-organismos silvestres utilizados para os testes de atividade enzimática, quatro leveduras e 10 isolados de solo de alambique apresentaram notável índice enzimático de atividade (IEA) em meio sólido e, com isso, foram inicialmente selecionadas. Dentre as linhagens pré-selecionadas, as leveduras mostraram baixa atividade celulásica em meio líquido, enquanto que dos isolados de solo de alambique destacaram-se TE13 e T8a, por apresentarem maior atividade hidrolítica em cultivo líquido contendo carboximetilcelulose. O TE13 foi o único micro-organismo a apresentar atividade na degradação da celobiose, apresentando-se assim, como promissor candidato para produção de celobiases. No entanto, nenhum micro-organismo testado apresentou atividade FPase, sugerindo que estes não são capazes de degradar um complexo altamente organizado como tiras de papel.

No estudo para avaliar a capacidade de produção de xilanases, nenhum dos vários micro-organismos testados mostrou resultados satisfatórios.

Setenta micro-organismos foram selecionados por sua capacidade de assimilação da xilose, porém, apenas três mostraram capacidade de produção de etanol. No entanto, a produção observada ainda é significativamente inferior àqueles encontradas na literatura.

Por fim, a identificação molecular dos isolados de solo de alambique com melhor desempenho na produção de celulases foi realizada. A linhagem TE13 foi identificada como pertencente ao gênero *Aspergillus*, enquanto que T8a foi identificada como pertencente ao gênero *Penicillium*, ambos relatados na literatura como fungos filamentosos com grande capacidade de produção de sistemas celulásicos.

A eletroforese com agente desnaturante (SDS) foi utilizada para determinar o perfil das proteínas no complexo enzimático formado em meio celulósico. Cabe destacar que os resultados dessa análise, somados aos resultados positivos observados na hidrólise de CMC e celobiose, permitem inferir que essa linhagem produziu endoglucanases e celobiases. Essa observação é suportada por comparação com dados da literatura que indicam a produção de proteínas de massas moleculares similares em micro-organismos do mesmo gênero.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, concluímos que os micro-organismos selecionados como bons produtores de enzimas do complexo celulásico e produtores de etanol podem ser promissores, porém, são necessários mais estudos para o desenvolvimento de uma formulação mais eficaz que possa ser utilizada industrialmente.

7. PERSPECTIVAS

Considerando-se o desempenho promissor na degradação de celulose apresentado pelos isolados TE13 e T8A, o presente trabalho pode desdobrar-se nas seguintes perspectivas:

- otimização da atividade enzimática, com ajustes de parâmetros tais como temperatura, pH, agitação, concentração molar do substrato, etc;

- otimização da produção enzimática para cultura em biorreatores;

- isolamento e purificação das enzimas produzidas;

- avaliação da possibilidade de uso dos isolados TE13 e T8A em um consórcio de micro-organismos, tendo como objetivo a degradação completa de material lignocelulósico para a produção de etanol;

- contínua bioprospecção de micro-organismos silvestres de diversas regiões brasileiras para a identificação de micro-organismos para a produção de enzimas capazes de degradar hemicelulose e fermentar pentoses.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, J. M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. (Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba-SP, 2008.

ALMEIDA, M. N. Celulases e hemicelulases de espécies endofíticas de *Acremonium.* (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa-MG, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁZ-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Biores. Technol.*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. *J. Milk and Food Technol.* v. 38, p. 570-572, 1975.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*., v. 72, p. 248-254, 1976.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated From the Brazilian Amazonian Forest. *PLOS ONE*, v. 7, n. 8, e43135, 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. Sacarificação da Biomassa Lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. *Revista Analytica*, p. 48-54, 2010.

CARRION, L. M. Isolamento de Leveduras Fermentadoras de Pentoses e suas Aplicações na Produção de xilitol e Etanol a partir do Licor Negro Proveniente do Processo de Kraft de Extração da Celulose. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto-SP, 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. J. Production, Properties and Application of Cellulases in the Hydrolysis of Agroindustrial Wastes.*Quim. Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A. K.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Biores. Technol*., v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renew. Energy*, v. 36, p. 3541-3549, 2011.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K. T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int. J. Biol. Sci.*, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEVI, M. C.; KUMAR, M. S. Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillusniger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, v. 2, p. 120-128, 2012.

EGGEMAN, T.; ELANDER, R. T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Biores. Technol*., v. 96, p. 2019-2025, 2005.

FERNANDEZ, D. E. R. Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. (Tese de Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba-PR, 2009.

FLORENCIO, C. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichodermasspp.* (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011.

FUGITA, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual

Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP, 2010.

GARCIA, D. Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia, Lorena-SP, 2012.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, F.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGELLUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel: A review. *Biores. Technol.*, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOLDBECK, R. Determinação das propriedades lignocelulolíticas e estudo genético de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões brasileiras visando a produção de bioetanol. (Tese de doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, 2012.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C. C. P.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI FILHO, F. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. *Afr. J. Biotechnol*, v. 11, p. 11595-11603, 2012.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, A. G. P.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Biores. Technol.*, v. 128, p. 797-803, 2013.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, β-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.*, v. 51, p. 72–78, 2010.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 4th ed., 2001.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 74, p. 937-953, 2007.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of

fungal xylanases. *Biores. Technol.*, v. 58, p.137-161, 1996.

HARGREAVES, P. I. Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2008.

HENRY, R. J. CANNON, D. C., WINKELMAN, J. Clinical chemistry principles an techniques, 2nd ed., Harper and Row Publishers Inc, N.Y., 1974.

JABASINGH, S. A.; VARMA, S.; GARRE, P. Production and Purification of Cellulase from *Aspergillusnidulans* AJSU04 under Solid-state Fermentation using Coir Pith. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 28, p. 143-151, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew. Sustain. En. Rev.*, v. 33, p. 188-203, 2014.

KADAM, K. L.; MCMILLAN, J. D. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Biores. Technol.*, v. 88, p. 17-25, 2003.

KOID, A.; NELSON, W. C.; MRAZ, A.; HEIDELBERG, K. B. Comparative analysis of eukaryotic marine microbial assemblages from 18S rRNA gene and gene transcript clone libraries by using different methods of extraction. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 3958–3965, 2012.

KORISH, M. Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. (Tese de Doutorado) Johannes Gutenberg-University Mainz, Institute of Microbiology and Wine Research, Mainz-DE, 2003.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 23, p. 411- 456, 1999.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LACKS, S. A.; SPRINGHORN, S. S. Renaturation of enzymes after polyacrilamide gel eletrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 7467-7473, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Ecol.*, v. 15, p. 575-591, 2006.

LEVINE, J. S. Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa. *Cambridge: The MIT Press*, 1996.

LI, X. L.; LJUNGDAHL, L. G. Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and Secretion of the Xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*., v. 62, p. 209-213, 1996.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: volume 3: Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol. Genet. Genomics*, v. 282, n. 3, p. 233-44, 2009.

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptative response of yeasts to furfural and 5-hydroximethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bishydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. v. 31, p. 345-352, 2004.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnol. and Bioeng.*, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MANRICH, A. Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas. (Tese de Doutorado) Universidade Federal de São Carlos,

São Carlos-SP, 2012.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 84*, p. 37-53, 2009.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals &biorefinery concept. *Prog. En. Comb. Sci.*, v. 38, p. 522-550, 2012.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccahromyces* complex. *FEBS J.*, v. 274, p. 656- 666, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOTTA, F. B. Triagem, Seleção, Produção e Caracterização da Enzima Xilanase a partir de Leveduras Silvestres. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Engenharia de Alimentos, Campinas -SP, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5 edition, W. H. Freeman, 2008.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quím. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHTA, K.; MORIYAMA, S.; TANAKA, H.; SHIGE, T.; AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum and sequence analysis of the encoding gene. *J. Biosci. Bioengin.*, v. 92, p. 262-270, 2001.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. (Tese de Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2003.

PASHA, C.; KUHAD R.C.; RAO, L. V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. *J. Appl. Microbiol.*, v. 103, p. 1480-1489, 2007.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal Cellulases. *Chem. Rev.*, v. 115, p. 1308-1448, 2015.

PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões brasileiras. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, 2006.

PICART, P.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Lett. App. Microbiol.*, v. 45, p. 108-113, 2007.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 169, p. 1696-1712, 2013.

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. *J. Chem. Technol. Biotechnol*., v. 85, p. 983-992, 2010.

RODRIGUES, G. Prospecção de Genes de Celulases presentes em Biblioteca Metagenômica. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP, 2008.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. *Rev. Brasil. Bot.*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.; IRWIN, N. Molecular cloning: a laboratory manual/Joseph Sambrook, David W. Russell; [assoc. ed.: Nina Irwin, Kaaren A. Janssen], 2001.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial Hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-Water wood extracts by pentose fermenting yeasts. *Biomass. and Bioenerg*., v. 39, p. 31-38, 2012.

SOARES, I.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 700-705, 2010.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010.

STÖCKER, M. Biofuels and Biomass-To-Liquid Fuels in the Biorefinery: Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass using Porous Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 47, n. 48, p. 9200-9211, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores.Technol.*, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TEN, L. N.; IM, W. T.; KIM, M. K.; KANG, M. S.; LEE, S. T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. *J. Microbiol. Methods*, v. 56, p. 375-382, 2004.

TSAO, G. T.; XIA, L.; CAO, N.; GONG, C. S. Solid-State Fermentation whith *Aspergillus niger* for Cellobiase Production. *Apll. Biochem. Biotechnol*., v. 84, p. 273-289, 2000.

VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*:

current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VARIZE, C. S. Isolamento e Seleção de Leveduras para Fermentação de Xilose. (Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba-SP, 2013.

ZAMPIERI, D. Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum* (Dissertação de Mestrado) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul-RS, 2011.

ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y.; GAO, P. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enz. Microb. Technol.*, v. 30, n. 6, p. 734-740, 2002.

ZHOU, J.; WANG, Y. H.; CHU, J.; ZHUANG, Y. P.; ZANG, S. L.; YIN, P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Biores. Technol.*, v. 99, p. 6826-6833, 2008.

9. ANEXOS

Tabela 11: Resultados de atividade enzimática de CMCase (U/mL) obtidos nos testes em meio líquido utilizando leveduras.

Linhagens	Tempo de cultivo (horas)													
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	360
A. strictum	0,013	0,029	0,076	0,086	0,112	0,137	0,134	0,174	0,188	0,119	0,180	0,179	0,194	0,185
T. reesei	0,013	0,013	0,013	0,013	0,047	0,030	0,030	0,033	0,039	0,180	0,228	0,228	0,207	0,257
EP7C	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,015	0,017	0,016	0,011	0,013	0,013	0,019	0,030
RR71	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,015	0,016	0,016	0,011	0,026	0,035	0,049	0,063
MA48A	0,013	0,013	0,013	0,013	0,018	0,015	0,015	0,015	0,015	0,011	0,013	0,013	0,017	0,020
MA43A	0,013	0,013	0,013	0,013	0,016	0,013	0,015	0,015	0,015	0,011	0,013	0,013	0,029	0,029

Tabela 12: Micro-organismos isolados de solo de alambique selecionados como bons produtores de CMCase (U/mL) em meios agitados.

Isolados	Tempo de cultivo (horas)													
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	360
A. strictum	0,013	0,029	0,076	0,086	0,112	0,137	0,134	0,174	0,188	0,119	0,180	0,179	0,194	0,185
T. reesei	0,013	0,013	0,013	0,013	0,047	0,030	0,030	0,033	0,039	0,180	0,228	0,228	0,207	0,257
T3AB	0,013	0,013	0,013	0,013	0,056	0,060	0,060	0,064	0,086	0,071	0,112	0,102	0,067	0,132
T3AC	0,013	0,013	0,013	0,013	0,082	0,106	0,087	0,098	0,100	0,011	0,013	0,013	0,019	0,017
T2HA	0,013	0,013	0,013	0,013	0,021	0,069	0,045	0,111	0,079	0,082	0,119	0,132	0,123	0,152
T2HB	0,013	0,013	0,013	0,013	0,046	0,018	0,013	0,013	0,035	0,026	0,051	0,057	0,060	0,065
TE13	0,013	0,079	0,091	0,120	0,146	0,214	0,205	0,228	0,238	0,207	0,245	0,246	0,212	0,229
TE11	0,013	0,013	0,037	0,022	0,105	0,110	0,141	0,139	0,114	0,057	0,068	0,077	0,063	0,077
T8A	0,013	0,013	0,031	0,027	0,119	0,164	0,164	0,165	0,184	0,087	0,112	0,103	0,104	0,128
T2HH	0,013	0,033	0,047	0,063	0,085	0,091	0,060	0,050	0,065	0,114	0,151	0,153	0,131	0,146
T2AA	0,013	0,013	0,013	0,013	0,040	0,038	0,047	0,040	0,052	0,011	0,030	0,034	0,055	0,070
T3LL	0,013	0,013	0,013	0,033	0,071	0,087	0,075	0,097	0,094	0,067	0,083	0,090	0,099	0,102

Glaci Venturini Moro

Curriculum Vitae

Maio/2015

Glaci Venturini Moro

Dados Pessoais

Nome	Glaci Venturini Moro
Filiação	Adelino Moro e Matilde Venturini Moro
Nascimento	22/07/1984 - Palmeira das Missões - RS - Brasil
Carteira de Identidade	2086053631 SJS - RS - 02/08/2005
CPF	004832920-79
Endereço residencial	Rua Professor Carvalho de Freitas 611/ 202 T02 Teresopolis - Porto Alegre 91720090, RS - Brasil Telefone: 51 82140373
Endereço profissional	Universidade Federal do Rio Grande do Sul Centro de Biotecnologia Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia Prédio 43421 Lab. 220 - Campus do Vale Porto Alegre – Rio Grande do Sul 91501-970, RS - Brasil Telefone: 51 3308 7309
Endereço eletrônico	e-mail para contato : glaciventurini@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

mai/2012 – atual Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Bioprospecção de Micro-organismos Brasileiros para o uso em síntese de biocombustíveis
Orientador: Marilene Henning Vainstein
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

mar/2010 – fev/2011 Especialização em Gestão da Qualidade para o Meio.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS,
Porto Alegre, Brasil
Título: Gestão de Resíduos Sólidos

mar/2004 – dez/2007 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, Brasil
Título: Perfil Fitoquímico e Morfológico de Lotus spp
Orientador: Simone Meredith Scheffer-Basso
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação profissional

2011 – 2012 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Vínculo: Bolsista DTI - Empresa incubada InovaBio
Atividade: Atividades relacionadas a produção de lipase e biodiesel
Carga horária: 40
Regime: Dedicação exclusiva

2010 – 2010 Neocorp Desenvolvimento de Projetos
Vínculo: Empregatício
Enquadramento funcional: Bióloga
Carga horária: 40
Regime: Integral

2009 – 2009 Top Line Embalagens Plásticas
Vínculo: Empregatício
Enquadramento funcional: Inspetor da Qualidade
Carga horária: 44
Regime: Integral

2009 – 2009 Nathus Vital Suplementos Alimentares
Vínculo: Prestação de Serviços
Enquadramento funcional: Técnica em Controle de Qualidade
Carga horária: 20
Regime: Parcial

Áreas de atuação

Biotecnologia
Biologia Celular e Molecular

Prêmios e títulos

2005 Prêmio ALUNO PESQUISADOR da Área das Ciências Agrárias
Universidade de Passo Fundo

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Scheffer-Basso, S. M.; Moro, G. V.; Orsato, J.; Albuquerque, A. C. S. Divergência genética em germoplasma de aveias silvestres com base em caracteres multicategóricos e quantitativos. *Revista Ceres*, v. 59, p. 654 – 667, 2012.

2. Moro, G. V.; Scheffer-Basso, S. M.; Reginatto, F. H.; Abdala, A. L.; Pecanha, M. R. S. R.; Costa, G. M. Aspectos químicos do gênero *Lotus* com ênfase em metabólitos secundários. *ARS Veterinária*, v. 26, p.113 - 119, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

1. Orsato, J.; Moro, G. V.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S.; Yorcseski, E. Caracterização Morfológica e Fenológica de Germoplasma de Aveias Silvestres (*Avena* sp). 57° Congresso Nacional de Botânica, Gramado, 2006.

2. Pezzini, D.; Rossi, L.; Moro, G. V.; Orsato, J.; Secco, D.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Divergência Genética em Trigo com Base em Caracteres Morfológicos. 57° Congresso Nacional de Botânica, Gramado, 2006.

3. Secco, D.; Moro, G. V.; Orsato, J.; Secco, D.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Caracterização Morfológica de Genótipos de trigo do BAG- Embrapa Trigo. 3° Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Gramado, 2005.

Apresentação de Trabalho (Pôster)

1. Moro, G. V.; Vainstein, M. H. Bioprospecção de micro-organismos para a utilização em síntese de biocombustíveis. XV Encontro Anual do PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

2. Moro, G. V.; Vainstein, M. H. Bioprospecção de micro-organismos para a utilização em síntese de biocombustíveis. XIV Encontro Anual do PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

3. Moro, G. V.; Vainstein, M. H.; Rodrigues, R. B. Seleção de micro-organismos produtores de lipase para aplicação na produção de biodiesel. XIII Encontro Anual do PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

4. Moro, G. V.; Vainstein, M. H.; Rodrigues, R. B.; Napp, A. P. Seleção de micro-organismos produtores de lipase para aplicação na produção de biodiesel. XII Encontro Anual do PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

5. Moro, G. V.; Orsato, J.; Scheffer-Basso, S. M.; Reginatto, F. H. Perfil Fitoquiímico e Morfológico de Lotus spp. XVI Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo, 2007.

6. Pezzini, D.; Rossi, L.; Moro, G. V.; Orsato, J.; Secco, D.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Divergência Genética em Trigo com Base em Caracteres Morfológicos. XV Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo, 2006.

7. Orsato, J.; Moro, G. V.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Diversidade Genética em Aveias Silvestres (*Avena* spp): Fonte de Variabilidade para o Melhoramento Genético. XV Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo, 2006.

8. Secco, D.; Moro, G. V.; Orsato, J.; Secco, D.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Caracterização Morfológica do Banco de Germoplasma de Trigo. III Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo, 2004.

Apresentação de Trabalho (Oral)

1. Moro, G. V.; Orsato, J.; Secco, D.; Scheffer-Basso, S. M.; Albuquerque, A. C. S. Divergência Genética num Conjunto de 205 Genótipos de Trigo. IV Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo, 2005.

Eventos

Participação em eventos

1. II Fórum Regional e I Fórum Estadual de Conservação e Biodiversidade, 2007.

2. Seminário Ética na Pesquisa, 2006.

3. 57° Congresso Nacional de Botânica - 13° Encontro Estadual de Botânicos, 2006.

4. XI Semana Acadêmica da Biologia e I Ciclo de Palestras de Ciências Biológicas "Biologia: A Ciência que revoluciona o Mundo", 2006.

5. X Semana Acadêmica da Biologia-Evolução: Aprendendo com o Passado, Vivendo o Futuro. Oficina "Análise Microscópica de Alimentos", 2005.

6. Aula Inaugural do Curso de Ciências Biológicas, 2005.

7. 3° congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005.

8. 1º Fórum Regional de Conservação e Biodiversidade, 2005.

9. IX Semana Acadêmica da Biologia, 2004.

10. VII Jornada de Morfologia, 2004.

11. Ciclo de Palestras: Hora Biológica, 2004.

Organização de evento

1. II Fórum Regional e I Fórum Estadual de Conservação e Biodiversidade, 2007.

2. XI Semana Acadêmica da Biologia e I Ciclo de Palestras de Ciências Biológicas "Biologia: A Ciência que Revoluciona o Mundo", 2006.