UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANÁLISE DO METABOLISMO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LAGARTAS (*Spodoptera frugiperda*) VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª E 3ª GERAÇÕES

LETÍCIA MARA MILANI

ORIENTADOR Prof. Dr Sérgio Luiz Alves Júnior

Outubro - 2021

LETÍCIA MARA MILANI

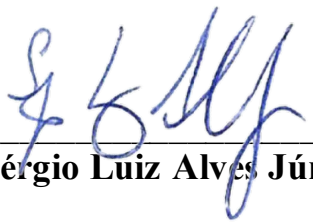
ANÁLISE DO METABOLISMO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LAGARTAS (*Spodoptera frugiperda*) VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª E 3ª GERAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

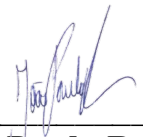
Orientador: **Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 15/10/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS



Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS

Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS

ANÁLISE DO METABOLISMO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LAGARTAS (*Spodoptera frugiperda*) VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª E 3ª GERAÇÕES

Milani, L. M.*[1], Alves, S. L. Jr.[1]

[1]Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS – *Campus* Chapecó – Santa Catarina

*leticiamilani3@gmail.com

RESUMO

Diante do cenário atual novas alternativas aos combustíveis fósseis são estudadas e cada vez mais, os biocombustíveis vem ganhando visibilidade. O Brasil, sendo o segundo maior produtor de etanol, atrás apenas dos EUA, possui uma produção anual de aproximadamente 35 bilhões de litros, porém, aproximadamente 99% desta produção é ainda proveniente de primeira geração (etanol 1G). Contudo, a biomassa residual deste processo possui grande quantidade de açúcares que podem ser também fermentados por leveduras, surgindo então o etanol de segunda geração (2G). Este processo mais recente elimina a necessidade de maiores áreas para cultivo de culturas energéticas e assim aumenta a segurança alimentar, por não concorrer com a produção de alimentos, e reduz a pegada hídrica, ao dispensar irrigação de maiores áreas agrícolas. Estudos também mostram que é possível a utilização de biomassa algal para uma terceira geração do combustível (etanol 3G). Neste sentido, o presente trabalho se propôs a conhecer um pouco da microbiota do estágio larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), conhecida como lagarta militar, uma praga agrícola que causa prejuízos principalmente a plantações de milho e cana-de-açúcar. Para este trabalho, foram isoladas 46 linhagens de levedura do intestino dessa lagarta, que passaram inicialmente por uma triagem, onde todas conseguiram metabolizar os carboidratos disponíveis (glicose e xilose). A partir desta triagem, escolheu-se as cinco linhagens que mais se destacaram em termos de crescimento celular, medido por densidade óptica a 570 nm e consumo de açúcares quantificados pelo método colorimétrico (DNS), para compor um delineamento experimental composto central (DCC). Foram realizados 11 ensaios, nos quais as variáveis independentes foram o pH, a temperatura e a concentração de NaCl. Constatou-se uma preferência por valores de pH mais elevados (pH 8,0), temperaturas mais baixas (15°C) e ausência de NaCl, condição em que se registrou o maior crescimento celular (65,7 unidades de absorbância) e o maior percentual de consumo dos carboidratos (43,12%) com as linhagens CHAP-164 e CHAP-206, respectivamente. Vistas as melhores condições de cultivo, as linhagens CHAP-164, CHAP-165 e CHAP-206 foram designadas para uma cinética fermentativa. As três linhagens apresentaram perfis de crescimento semelhantes, e não consumiram totalmente os açúcares durante as 52 h de fermentação. Houve uma pequena produção de etanol nas últimas horas do experimento observada para a CHAP-206, sendo 0,67 g/L o valor máximo. Contudo, após análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi identificado a produção de glicerol, demonstrando assim um estresse osmótico sofrido pelas células, causado possivelmente pela concentração de ácido acético e NaCl utilizados nos meios de cultivo. Embora não tenham sido observados os valores de produção de etanol almejados pela indústria, o estudo contribuiu com a elucidação do metabolismo de açúcares em leveduras selvagens encontradas na microbiota intestinal de lagartas.

Palavras-chave: glicose; xilose; ácido acético; NaCl; xilitol.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol combustível, com aproximadamente 35,6 bilhões de litros anuais (CONAB, 2020), correspondente a 27,8% da produção mundial (RFA, 2019). O etanol 1G é obtido pela fermentação do caldo e/ou melaço da cana-de-açúcar, sendo um processo já amplamente conhecido e otimizado, porém ainda é um processo oneroso do ponto de vista ambiental.

Desse modo, a preocupação com a segurança alimentar e a pegada hídrica merecem destaque, e passam a ser vislumbradas tecnologias alternativas. Nesse sentido, a produção de etanol 2G se propõem a aproveitar a biomassa residual gerada no primeiro processo. A fermentação é realizada pela levedura considerada, até então, a mais bem adaptada às dornas de fermentação, denominada *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, esse processo ainda necessita de alguns ajustes para que se torne eficiente e seja otimizado, uma vez que *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar xilose e celobiose, carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica (STAMBUK et al., 2008; LEE et al., 2013).

Outra alternativa aos combustíveis fósseis, recente e pouco explorada, é a produção de etanol 3G, proveniente da fermentação da biomassa de macro e microalgas verdes, vermelhas e marrons, processo este que não possui as desvantagens encontradas na primeira e segunda geração (COSTA, 2010). As algas são classificadas em até seis grupos distintos, de acordo com o tipo de pigmento fotossintetizante que possuem, sendo as principais delas: Clorofíceas (algas verdes), Rodofíceas (algas vermelhas) e as Feofíceas (algas pardas ou marrons). O Brasil, considerado um país com ampla diversidade biológica, possui também condições favoráveis para o cultivo dessas algas, o que o torna potencialmente competitivo no mercado dos biocombustíveis (EMBRAPA, 2016).

Para que ocorra a otimização dos processos apresentados, de etanol 2G e 3G, é necessário, primeiramente, o pré-tratamento da biomassa e a hidrólise dos seus polissacarídeos, liberando seus mono e dissacarídeos que serão posteriormente fermentados por leveduras. Como já mencionado, a levedura *S. cerevisiae* possui alguns entraves na fermentação, fazendo com que alternativas sejam buscadas para solucionar esse problema. Existem algumas soluções que já foram propostas, como a utilização da engenharia genética (STAMBUK et al., 2008; LEE et al., 2013) para expressar heterologamente enzimas em *S. cerevisiae*, e/ou encontrar leveduras selvagens que possam ser utilizadas nas dornas de fermentação (ELIODÓRIO et al. 2019).

Um dos problemas enfrentados no processo de pré-tratamento é a formação de inibidores (LI; WENG; CHAPPLE, 2008), que podem atuar de forma negativa tanto no processo de hidrólise quanto no processo de fermentação posteriormente. O ácido acético é um deles, sendo normalmente encontrado em hidrolisados lignocelulósicos ou algais, gerado durante o pré-tratamento da hemicelulose. Casey et al. (2010) afirma que são esperados até 15 g/L de inibidores em biomassas variadas. Neste sentido, é de suma importância a prospecção de leveduras que tolerem os inibidores gerados no pré-tratamento.

Podem ser gerados também alguns subprodutos durante a fermentação, um deles, no entanto, com alto valor agregado para as biorrefinarias (ANTUNES et al., 2021) e de elevado interesse biotecnológico é o xilitol. O xilitol é um poliálcool com propriedades adoçantes sendo utilizado principalmente nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias. Esta rota biotecnológica de produção de xilitol ocorre a partir da redução biológica da xilose dentro das células das leveduras e se apresenta como alternativa verde e mais rentável à extração por rotas químicas em condições, que requerem condições extremas de temperatura (CARNEIRO; SILVA; ALMEIDA, 2019).

A prospecção de potenciais linhagens fermentadoras deve levar em consideração o atendimento a outro requisito como a tolerância a concentrações de NaCl, para que se possa fazer o uso de água não potável, e até mesmo água do mar nas dornas de fermentação, reduzindo assim a pegada hídrica da produção de etanol (INDIRA et al., 2018). Sabe-se que a quantidade de água potável utilizada para a produção etanol é bem expressiva, podendo atingir um volumes de até 1344 L por litro de etanol 1G produzido a partir de cana-de-açúcar (HILOIDHARI *et al.*, 2021) e de até 672 L por litro de etanol 2G (MURALI; SHASTRI, 2019).

Assim sendo, a prospecção de leveduras selvagens precisa levar em conta as situações acima apontadas, garantido que os microrganismos fermentadores possam tolerar os fatores de estresse celular a que são submetidos nas dornas de fermentação. Com base nos trabalhos da literatura analisados, constata-se a possibilidade de utilizar, para esse propósito, leveduras isoladas da microbiota intestinal de insetos. Por apresentarem herbivoria em sua fase larval (LEWINSOHN; JORGE; PRADO, 2012), alguns insetos consomem uma ampla variedade de vegetais em sua dieta, ingerindo assim os mais variados carboidratos. Nesse processo, ocorre também a ingestão de algumas leveduras que já estão presentes na superfície foliar (SPERANDIO, 2012). Logo, as leveduras isoladas mostram-se como potenciais microrganismos que possam vir a metabolizar os carboidratos de interesse para a produção de etanol 2G, como a glicose e a xilose, e também os carboidratos oriundos da fermentação do etanol 3G como é o caso da manose, galactose e ramnose (GREETHAM et al., 2018).

A microbiota intestinal dos insetos é reflexo de sua alimentação diversificada, o que lhes confere uma enorme gama de microrganismos e enzimas (ALVES et al., 2019), que auxiliam na digestão do alimento (MILANO, 2012), degradam compostos xenobióticos, impedem que patógenos se instalem e ajudam na ciclagem dos nutrientes (ROLIM, 2014).

Alguns trabalhos na literatura mostram microrganismos e enzimas isolados de diferentes insetos, tais como de cupins da espécie *Coptotermes formosanus*, sendo proposta a construção de um consórcio microbiano integrado por um mix de bactérias e leveduras, utilizado para medir a capacidade de degradação da celulose e da lignina, produção e atividades das enzimas lignocelulolíticas e a produção de etanol (ALI et al., 2018). Isolada de larvas de bicho-da-seda, uma nova espécie de levedura do gênero *Blastobotrys* foi descoberta, demonstrando potencial para produção de etanol lignocelulósico (BARRETO et al., 2018). Em larvas de besouro, foram encontradas espécies já identificadas e com potencial de fermentar a xilose, como

Scheffersomyces parashehatae, Scheffersomyces illinoinensis, Spathaspora arborariae e Wickerhamomyces rabaulensis (CADETE et al., 2017).

A *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) possui origem nas zonas tropicais, com ocorrência em toda a América. Sua fase larval é conhecida popularmente como lagarta militar ou lagarta do cartucho (referente a conformação da planta do milho no estádio de desenvolvimento V8) (EMBRAPA, 2015) e reconhecida como uma praga por atacar as culturas de milho e cana-de-açúcar (CHORMULE et al., 2019). A espécie tem um ciclo de vida completo passando por quatro fases, sendo elas: ovos, lagartas, pupas e adultos. Na fase adulta uma fêmea chega a colocar a cada postura em média de 100 ovos, que eclodem em torno de 5 dias e passam para a fase de larva, durando em torno de 14 a 22 dias (PROMIP, 2019). É nesse período que a *S. frugiperda* causa os maiores danos às plantações, chegando a 34% (CRUZ; VIANA; WAQUIL, 2009) no caso do milho, visto que se alimenta dos dois estádios da planta, o vegetativo e o reprodutivo.

Essa lagarta apresenta herbivoria e é polífaga (SARMENTO et al., 2002), se alimentando, além do milho, de aproximadamente outras 100 espécies vegetais, como milheto, sorgo, trigo, arroz, feijão, soja e algodão. Com reprodução e crescimento acelerados, além de ampla variabilidade de vegetais hospedeiros, sua disseminação nas áreas de culturas é facilitada (PROMIP, 2019). A rotação de culturas também favorece seu deslocamento através das chamadas “pontes verdes”, onde a mariposa migra de um local para outro depositando seus ovos. Barros et al. (2010) afirmam que o uso e o consumo de diferentes fontes alimentares, além da preferência dessa lagarta com o hospedeiro afeta significativamente a composição nutricional da sua microbiota.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo analisar leveduras isoladas do intestino de lagartas militares, com vistas a bioprospecção de linhagens com potencial de aplicação na indústria, para a otimização da produção de etanol de 2ª e 3ª gerações.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 Linhagens de leveduras utilizadas

Foram utilizadas 46 linhagens de leveduras já catalogadas pelo Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM) da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapecó. Essas linhagens foram previamente isoladas do intestino de lagartas militares (*Spodoptera frugiperda*), conforme descrito por Cadete et al (2017) e se encontram armazenadas em 30% de glicerol a -80 °C, no Laboratório de Bioquímica e Genética do Campus Chapecó. Utilizou-se também a linhagem (FLONA-CE-3.4), isolada de biomassa de matéria vegetal em decomposição extraída da Unidade de Conservação da Floresta Nacional de Chapecó (FLONA), como controle positivo, devido a cepa mostrar-se apta ao crescimento em meio de cultivo contendo xilose como fonte de carbono.

2.2 Triagem inicial de leveduras

Inicialmente as leveduras isoladas foram submetidas a uma triagem para avaliar suas capacidades de consumo de glicose e xilose, os dois principais carboidratos encontrados em hidrolisados lignocelulósicos (ELIODÓRIO et al. 2019). Logo, uma alçada de células (1 µL) foi retirada do slunt e pré-inoculada em um erlenmeyer com 5 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose). Após 48 h de incubação, transferiu-se uma alíquota de 1/100 desse volume inicial para outro frasco erlenmeyer com 10 mL de meio YNB (base nitrogenada de levedura a 0,67%), contendo alternadamente 2% de glicose ou xilose como fontes de carbono, com pH 5,0. Os frascos foram incubados a 30 °C por mais 24 h, com agitação constante de 150 rpm. Após esse período, coletou-se uma alíquota para aferir a biomassa celular através da densidade óptica a 570 nm (DO_{570nm}). O restante da alíquota foi centrifugado a 5000 *g* por 3min30s e seu sobrenadante coletado e armazenado a -20 ºC para posterior dosagem de açúcares redutores (conforme descrito no item 2.5).

2.3 Delineamento Composto Central

Após a triagem inicial das 46 linhagens analisadas, foram escolhidas 5 delas que mais se destacaram no consumo dos carboidratos, para em seguida realizar um delineamento experimental composto central (DCC).

O experimento teve início com o preparo do inóculo em frasco erlenmeyer com 5 mL de meio YPD (conforme descrito anteriormente), incubado por 48 h em agitação constante de 150 rpm e temperatura de 30 °C. Subsequentemente, inoculou-se 1/100 (v/v) em 5 mL de meio YNB (base nitrogenada de levedura a 0,67%) com 20 g/L de cada um dos seguintes monossacarídeos: glicose, xilose, manose, galactose e ramnose. Foi adicionado também ao meio uma concentração de ácido acético a 2,5 g/L. O meio foi acrescido de NaCl com concentrações de 0 g/L, 17,50 g/L e 35 g/L, com variações de pH de 2, 5 e 8, e as temperaturas selecionadas para a incubação foram de 15, 30 e 45ºC, de acordo com a matriz mostrada na Tabela 1, gerada com o auxílio do *software* Protimiza Experimental Design (http://experimental-design.protimiza.com.br/; Rodrigues e Iemma, 2014).

A amostragem foi realizada 48 h após o inóculo, para medir o crescimento celular pela densidade óptica a 570 nm (DO_{570nm}). Outra parte da alíquota foi centrifugada e seu sobrenadante coletado e guardado para posteriormente quantificar os açúcares redutores totais (conforme descrito no item 2.5).

De acordo com esse planejamento experimental foram realizados 11 experimentos, com três variáveis, possibilitando, ao final, calcular e comparar os resultados entre as cepas para a produção de biomassa e o percentual de consumo de açúcares totais.

Tabela 1 – Delineamento composto central (DCC) para avaliação da influência da temperatura, do pH e do NaCl no crescimento celular das linhagens.

Nº experimento	NaCl (g/L)	pH	Temperatura (ºC)
1	0	2	15
2	35	2	15
3	0	8	15
4	35	8	15
5	0	2	45
6	35	2	45
7	0	8	45
8	35	8	45
9	17,50	5	30
10	17,50	5	30
11	17,50	5	30

Fonte: Elaborada pela autora

2.4 Cinética fermentativa

Ao término do DCC, foram selecionadas as três linhagens de leveduras que apresentaram maior capacidade de consumir os carboidratos. Estas foram submetidas a uma cinética fermentativa, sendo observado qual cepa teve maior capacidade de fermentar os carboidratos disponíveis, sendo que a melhor condição de temperatura e pH foi definida a partir dos dados do DCC (descrito na seção 2.3).

A cinética foi conduzida em meio sintético YNB, acrescido de 20 g/L de cada um dos carboidratos (glicose, xilose, manose e ramnose), 2,5 g/L de ácido acético, 17,5 g/L de NaCl e as condições de temperatura e pH apontadas pelo DCC: 15°C e pH 8,0. Retirou-se alíquotas a cada 3 h durante um total de 52 h de experimento, para análise da biomassa celular por espectrofotometria a 570 nm (DO_{570nm}) e a outra parte da alíquota foi centrifugada a 5000 *g* por 3min30s e coletado o sobrenadante para posteriores análises de produção de etanol, xilitol e quantificação dos açúcares (conforme descrito no item 2.5).

2.5 Métodos analíticos

A quantificação dos açúcares redutores totais (glicose, xilose, manose, galactose e ramnose) foi realizada através do método colorimétrico DNS em microplaca, conforme descrito por Santos et al (2017). Uma curva de calibração padrão para cada açúcar analisado foi montada, com concentrações de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 2,0 g/L. Adicionou-se em cada um dos 96 poços da microplaca 25 µL de amostra (diluída 60 vezes para ficar dentro da curva de calibração) e 25 µL do reativo DNS. A placa foi selada com filme plástico e levada para banho fervente durante 5 min. Após, resfriou-se a placa em gelo e acrescentou-se de 330 µL de água destilada, sendo realizada na sequência a leitura dos valores em uma leitora de microplacas a 490 nm.

A quantificação de etanol, xilitol e glicerol produzidos durante as fermentações foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; LCMS-2020, Shimadzu), com detector por índice de refração (RID-10A, Shimadzu) e coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H Bio-Rad) nas seguintes condições: fase móvel com 5,0 mM de ácido

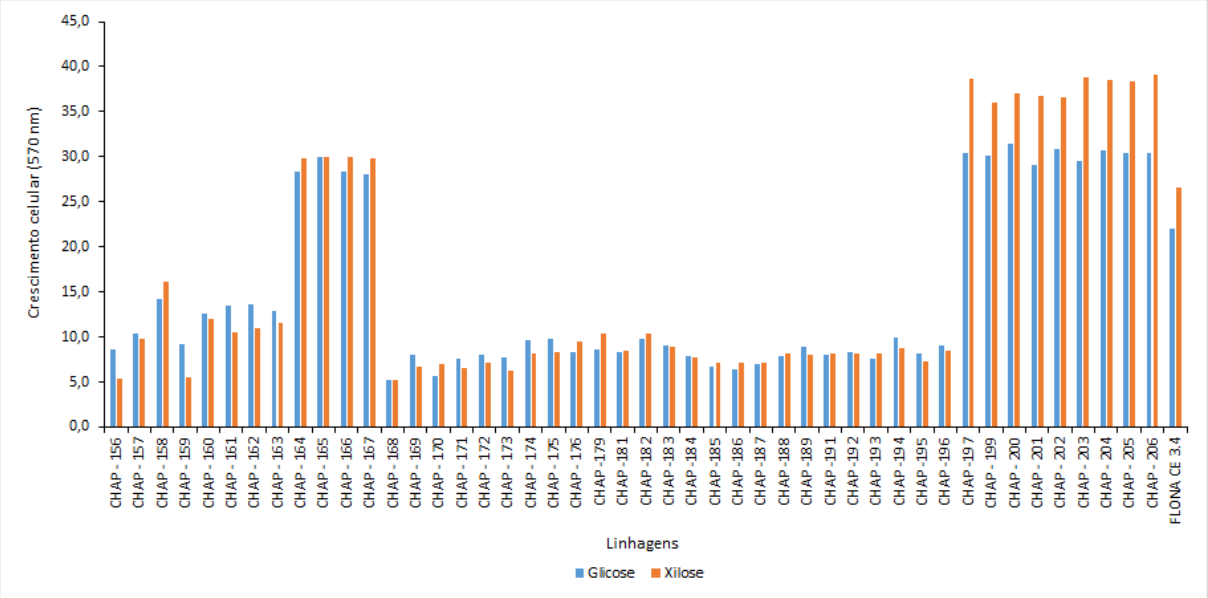
sulfúrico, a 50 ºC, com fluxo de 0,6 mL/min durante 25 minutos por amostra. As curvas de calibração foram aplicadas para todas as amostras analisadas, utilizando sete concentrações diferentes na faixa de 0,25 a 20,0 g/L de cada composto analisado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem inicial de leveduras

No intuito de avaliar o crescimento celular das 46 linhagens isoladas do intestino de lagartas (*Spodoptera frugiperda*), a triagem inicial mostrou que todas as linhagens conseguiram metabolizar os carboidratos disponíveis e apresentaram um perfil de crescimento similar para ambos (glicose e xilose), com destaque para 13 delas (28,2%), denominadas CHAP-164, CHAP-165, CHAP-166, CHAP-167, CHAP-197, CHAP-199, CHAP-200, CHAP-201, CHAP-202, CHAP-203, CHAP-204, CHAP-205 e CHAP-206, chegando a uma densidade óptica (OD_{570nm}) de até 39,0 de acordo com a figura 1. Como controle positivo foi utilizada a linhagem FLONA-CE-3.4, que possui histórico de crescimento em meios contendo glicose e/ou xilose como fonte de carbono, de acordo com dados deste grupo de pesquisa ainda não publicados.

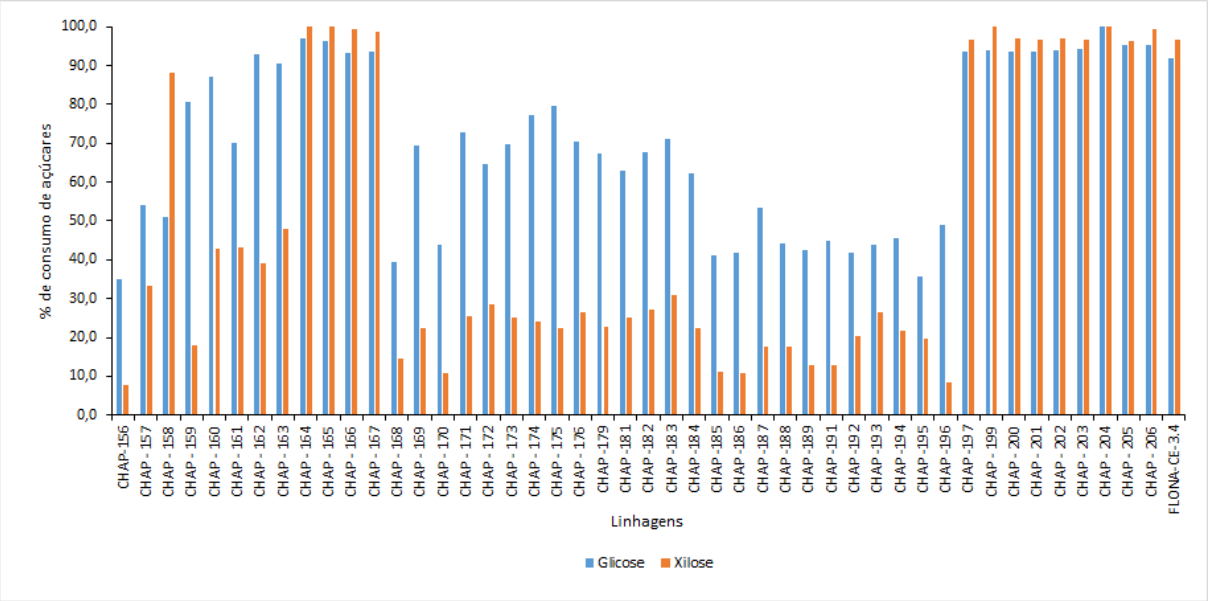
Figura 1 – Crescimento celular das 46 linhagens selvagens isoladas de lagartas e da linhagem FLONA-CE-3.4 em meio sintético YNB contendo alternadamente 2% de glicose ou xilose como fonte de carbono.



Fonte: Elaborada pela autora

Analisou-se também o percentual de açúcares (glicose e xilose) consumidos por cada linhagem. A quantidade inicial de carboidrato disponível era de 20 g/L. Os dados de consumo de açúcares estão apresentados na figura 2.

Figura 2 – Percentual de consumo de glicose e xilose das 46 linhagens selvagens isoladas de lagartas e da linhagem FLONA-CE-3.4.



Fonte: Elaborada pela autora

A partir dos dados da Figura 2 podemos inferir que 16 linhagens consumiram mais de 90% do açúcar disponível, sendo aproximadamente 34% das linhagens.

Com base nos perfis de crescimento celular vistos acima (figura 1) e no percentual de consumo de açúcares da figura 2, foram escolhidas as cinco linhagens que mais apresentaram crescimento e que consumiram praticamente 100% dos carboidratos disponíveis, sendo elas CHAP-164, CHAP-165, CHAP-199, CHAP-204 e CHAP-206 para compor o delineamento composto central (DCC).

3.2 Delineamento Composto Central

A fim de testar as linhagens em determinadas condições, o DCC ocorreu com 11 experimentos seguindo a Tabela 1 citada na seção de Procedimentos Metodológicos e possibilitou a comparação entre as linhagens frente a influência da temperatura, do pH e da concentração de NaCl. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 2.

Os ensaios E1 e E2, ambos com pH 2,0 e temperatura de 15 °C, sugerem que um pH muito baixo prejudica o metabolismo celular e inviabiliza o crescimento das leveduras. Neste caso, não é possível afirmar que tenha havido influência do NaCl, haja vista que E1 possuia 35 g/L de NaCl e E2 não possui adição deste sal. Nos ensaios E5, E6, E7 e E8, os crescimentos celulares também foram praticamente nulos, possivelmente em razão da temperatura de 45 °C. De fato, a literatura reporta que a temperatura ideal para a maioria das linhagens de leveduras é 30 °C (ALVES et al., 2019b).

Por outro lado, nas condições de E3 e E4, foram observados os maiores valores de crescimento celular e consumo de açúcares. Vale notar que ambos os experimentos foram realizados em condições de temperatura de 15 °C e com pH 8,0, diferenciando-se apenas na concentração de NaCl, sendo E4 com a concentração máxima (35 g/L) e E3 ausente. Embora

os valores tenham sido inferiores em E4, os dados sugerem que as células se mantêm viáveis apesar da concentração de sal em nível semelhante ao da água do mar. Vale notar que leveduras halofílicas vêm sendo isoladas e caracterizadas recentemente. Barreto et al. (2018), por exemplo, mostrou que uma linhagem isolada de bicho-da-seda apresentou crescimento mesmo quando submetida a meio de cultivo com adição de 10% de NaCl.

Em relação à variação de pH, os dados da Tabela 2 sugerem uma preferência das leveduras pelo pH 8,0. Cabe lembrar que todos os meios utilizados no DCC foram acrescidos de 2,5 g/L de ácido acético, e que dados na literatura demonstram que com 2,0 g/L desse ácido carboxílico já é possível ocorrer inibição do crescimento celular para algumas linhagens (SENATHAM et al., 2016; DU et al., 2019). Casey et al. (2010) afirmam que, ao aumentar os valores de pH, o efeito inibitório do ácido acético é diminuído, o que explica um maior crescimento das linhagens deste trabalho em pH 8,0. Esta relação entre pH e influência do inibidor também foi verificada recentemente em trabalho do nosso grupo de pesquisa, que demonstra maior desempenho de uma cepa selvagem diante de condições mais alcalinas na presença do referido ácido (BONATTO *et al.*, 2019).

Alguns microrganismos conseguem crescer em ambientes com condições fisico-químicas extremas, como é o caso de temperaturas baixas, onde o crescimento se desenvolve até 15 °C. Estes microorganismos são denominados psicrófilos, podendo ser o caso das linhagens analisadas neste trabalho. Sarmento et al. (2002), indica que o desenvolvimento ideal da lagarta *S. frugiperda* é observado em temperaturas entre 25 °C a 32 °C, entretanto Patel (1981) afirma que temperaturas elevadas são prejudiciais para o desenvolvimento da espécie (*S. frugiperda*) e cita que seu ciclo de vida é favorecido em temperaturas mais baixas. Assim, pode-se concluir que as leveduras presentes do trato intestinal das lagartas se adaptam e preferem temperaturas mais baixas.

Os ensaios E9, E10 e E11 (triplicata do ponto central) foram realizados na condição intermediária de todas as variáveis, ou seja, com temperatura de 30 °C, pH 5,0 e 17,5 g/L de NaCl. Nessas condições, observou-se um crescimento mediano de até 24,6 (OD_{570nm}). Todas as linhagens avaliadas apresentaram perfis de crescimento semelhantes para os mesmos ensaios realizados no delineamento. As figuras 3, 4 e 5 a seguir mostram os gráficos de pareto e as superfícies de resposta para as 3 linhagens escolhidas para a subsequente cinética fermentativa. Conforme análises em conjunto com o *software* Protimiza, os gráficos de pareto indicam que as variáveis pH (x2) e temperatura (x3) exercem efeito significativo positivo (tcalc positivo), ou seja influenciam de maneira positiva o crescimento das linhagens.

Tabela 2 – Biomassa celular e percentual de ART consumido pelas linhagens CHAP-164, CHAP-165, CHAP-199, CHAP-204 e CHAP-206 nas condições estabelecidas no delineamento composto central.

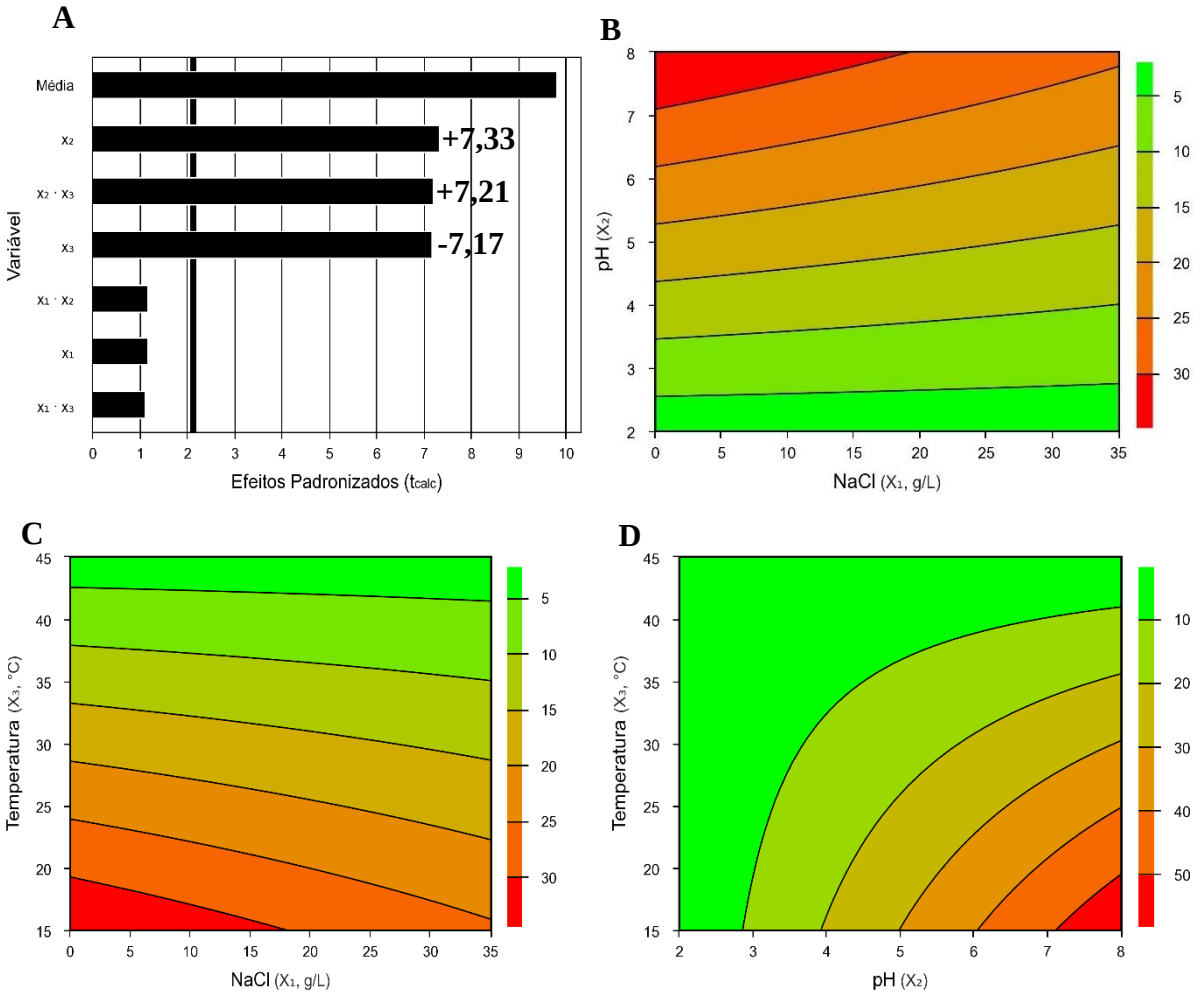
	CHAP-164		CHAP-165		CHAP-199		CHAP-204		CHAP-206	
Ensaio	Biomassa celular[a]	ART consumido (%)[b]	Biomassa celular[a]	ART consumido (%)[b]	Biomassa celular[a]	ART consumido (%)[b]	Biomassa celular[a]	ART consumido (%)[b]	Biomassa celular[a]	ART consumido (%)[b]
1	0,34	0,00	0,36	0,00	0,36	0,00	0,35	6,89	0,39	0,00
2	0,40	0,00	0,40	3,39	0,41	1,89	0,39	0,00	0,42	0,00
3	65,70	42,84	63,60	40,43	61,65	35,18	63,75	40,06	59,55	43,12
4	47,85	17,99	45,75	13,74	46,95	11,57	46,50	20,92	41,10	14,74
5	0,55	0,00	0,53	0,00	0,52	0,00	0,45	0,00	0,44	0,00
6	0,51	0,00	0,51	0,00	0,49	0,00	0,53	0,00	0,49	0,00
7	1,13	0,00	1,38	0,00	2,00	0,00	1,79	0,00	2,85	0,00
8	0,86	0,00	1,22	0,00	1,61	0,00	2,01	0,00	2,22	0,00
9	21,10	0,00	24,50	0,00	24,40	0,00	16,50	0,00	18,10	0,00
10	17,80	0,00	23,70	2,28	23,60	4,67	17,30	0,00	17,10	0,00
11	22,20	0,00	24,30	0,00	24,60	0,00	18,20	0,16	18,10	0,00

[a] Valores de densidade óptica ($DO_{570\ nm}$)

[b] Percentual de ART consumido

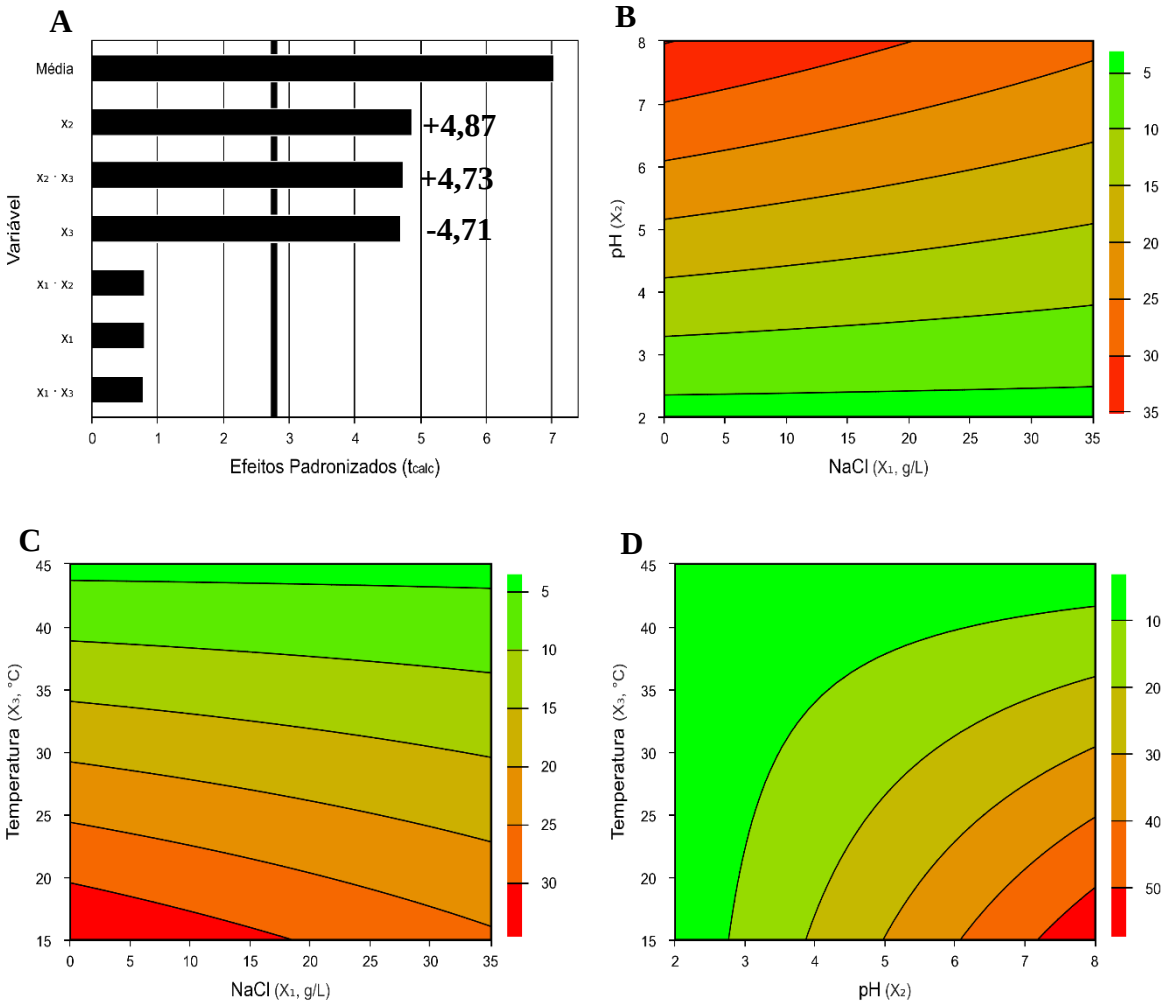
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 3 – Gráfico de Pareto para a variável dependente biomassa celular (A) e curvas de contorno (B, C, D) com um nível de significância de 5% (α = 5%), mostrando a influência das variáveis NaCl (x1), pH (x2) e temperatura (x3), para a linhagem CHAP-164.



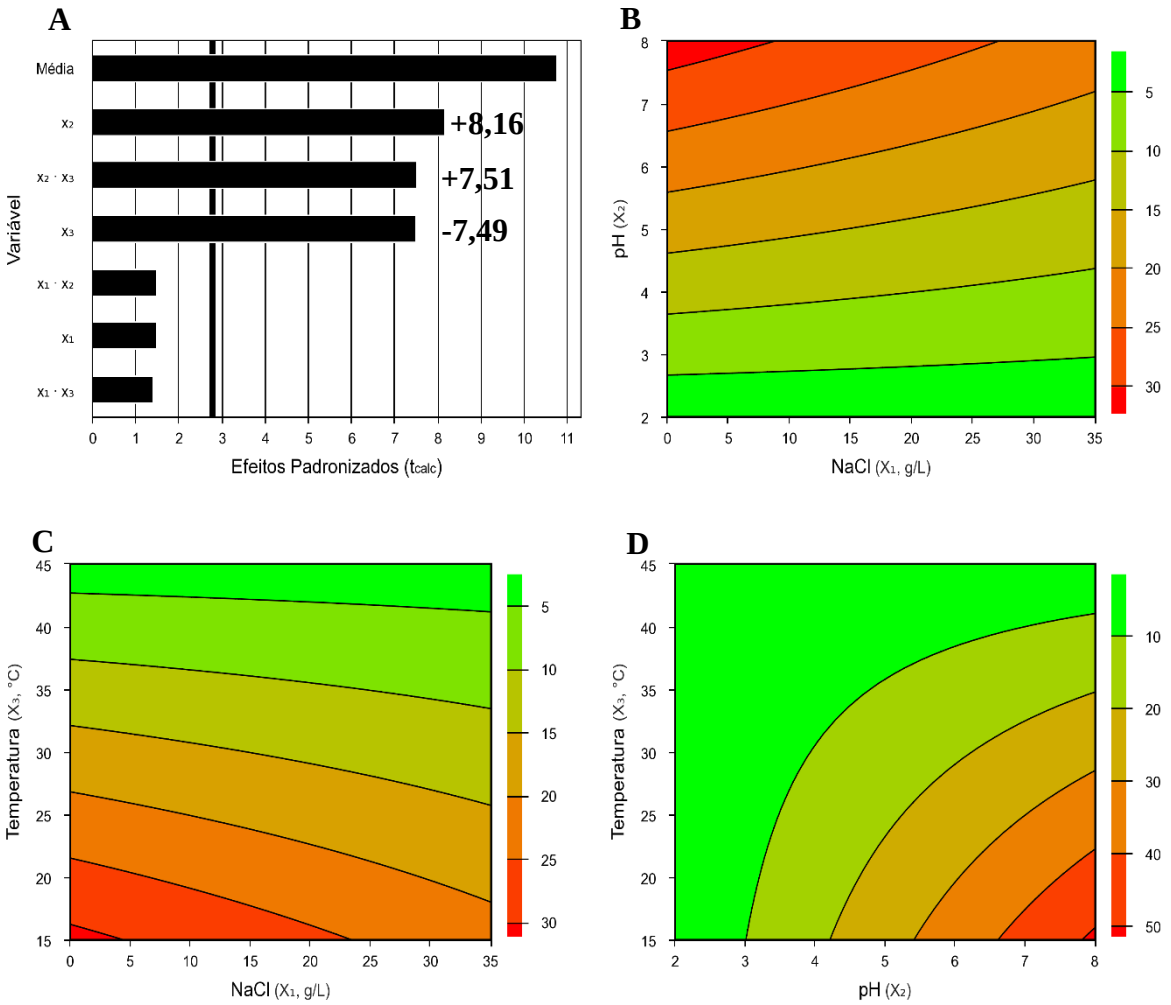
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4 – Gráfico de Pareto para a variável dependente biomassa celular (A) e curvas de contorno (B, C, D) com um nível de significância de 5% (α = 5%), mostrando a influência das variáveis NaCl (x1), pH (x2) e temperatura (x3), para a linhagem CHAP-165.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5 – Gráfico de Pareto para a variável dependente biomassa celular (A) e curvas de contorno (B, C, D), com um nível de significância de 5% (α = 5%), mostrando a influência das variáveis NaCl (x1), pH (x2) e temperatura (x3), para a linhagem CHAP-206.



Fonte: Elaborada pela autora

Para as linhagens CHAP-164, CHAP-165 e CHAP-206, foram encontrados coeficientes de determinação (R^2) da densidade óptica de 97,58%, 94,61% e 97,89% respectivamente. A partir disso, foram gerados modelos matemáticos que representam a dinâmica dos dados e possibilitam a substituição de valores gerando resultados coerentes, podendo ser empregado previamente para possíveis testes antes de realizar experimentos. As equações 1, 2 e 3 a seguir apresentam os modelos obtidos para as linhagens CHAP-164, CHAP-165 e CHAP-206, respectivamente:

$$Y_1 = 16{,}22 - 2{,}26\, x_1 + 14{,}22\, x_2 - 13{,}91\, x_3 - 2{,}27\, x_1 x_2 + 2{,}18\, x_1 x_3 - 13{,}99\, x_2 x_3 \quad \textbf{(Equação 1)}$$

$$Y_1 = 16{,}93 - 2{,}25\, x_1 + 13{,}77\, x_2 - 13{,}31\, x_3 - 2{,}25\, x_1 x_2 + 2{,}20\, x_1 x_3 - 13{,}38\, x_2 x_3 \quad \textbf{(Equação 2)}$$

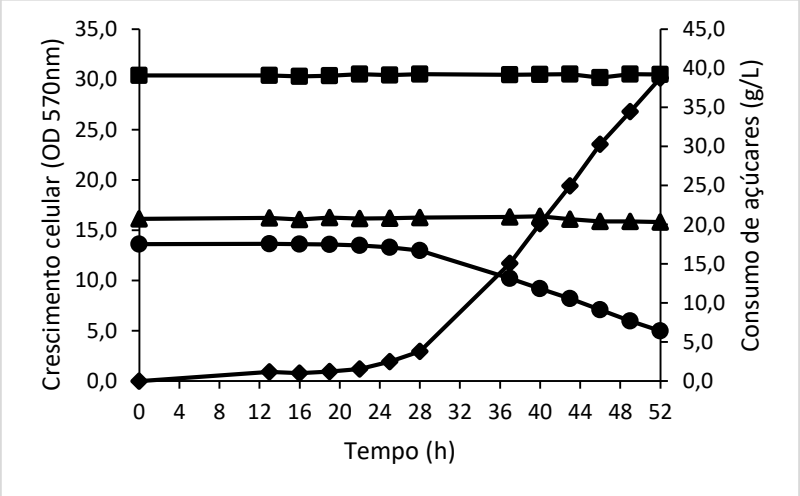
$$Y_1 = 14{,}61 - 2{,}37\, x_1 + 13\, x_2 - 11{,}93\, x_3 - 2{,}39\, x_1 x_2 + 2{,}23\, x_1 x_3 - 11{,}96\, x_2 x_3 \quad \textbf{(Equação 3)}$$

3.3 Cinética fermentativa

As três linhagens que apresentaram os maiores crescimentos celulares e percentuais de consumo de açúcar no DCC (CHAP-164, CHAP-165 e CHAP-206), foram submetidas a condições de cultivo similares aos do ensaio 3 e 4 do DCC, exceto pela concentração de NaCl. Tendo em vista as superfícies de resposta geradas para essas cepas (figuras 3 a 5), optou-se pelo valor intermediário (17,5 g/L) do sal. Embora o efeito da concentração de sal não tenha sido significativo, os dados sugerem que a ausência de NaCl beneficia o crescimento das leveduras. Além disso, com vistas a reduzir a pegada hídrica na produção do etanol, utilizando água não potável nas dornas de fermentação, é recomendável a prospecção de microrganismos fermentadores submetidos a estresse osmótico.

Durante as cinéticas de fermentação, as três linhagens apresentaram fase *lag* de aproximadamente 24 h (figuras 6 a 8). Essa extensa fase de adaptação foi possivelmente ocasionada pela troca de meio de cultivo, haja vista que o meio dos pré-inóculos pé-de-cuba (YPD) é considerado um meio ideal para o crescimento das células, contendo todos os nutrientes necessários (OLIVEIRA, 2014). Contudo, o meio da cinética fermentativa (YNB), para o qual as células foram transferidas no momento do inóculo, é considerado mínimo, com disponibilidade mais restrita de nutrientes (ALVES JR. *et al.*, 2007). Outro fator considerável que pode ter desencadeado essa longa adaptação foi a quantidade de carboidrato quatro vezes superior no meio YNB (80 g/L), além da adição de 17,5 g/L de NaCl, que se configura em maior estresse osmótico (BETLEJ *et al.*, 2020). Os perfis de crescimento celular mostraram-se bem semelhantes entre si. O desvio padrão calculado foi sempre inferior a 10%, sugerindo satisfatória reprodutibilidade dos experimentos, realizados em triplicata.

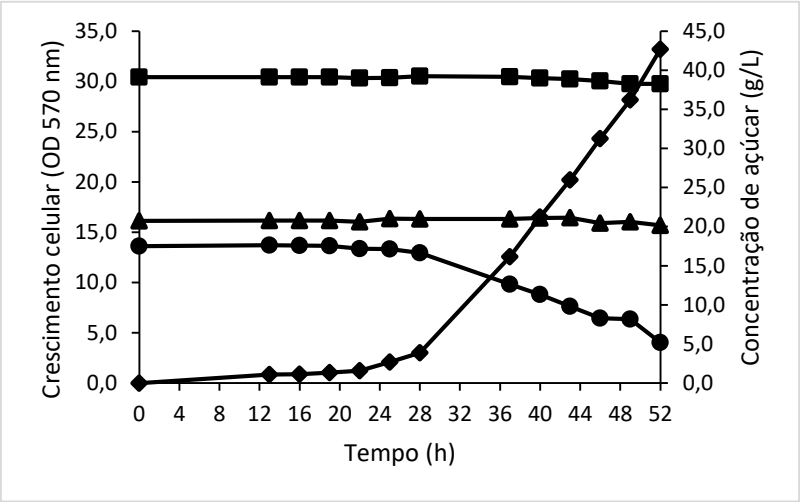
Figura 6 – Cinética fermentativa da linhagem CHAP-164, biomassa (◆), consumo de açúcares como glicose (●), ramnose (▲) e xilose + manose* (■).



Nota: * Os carboidratos xilose e manose foram quantificados em conjunto, não foi possível a separação de ambos, pois estes saem no mesmo tempo na coluna utilizada para a quantificação das amostras deste trabalho.

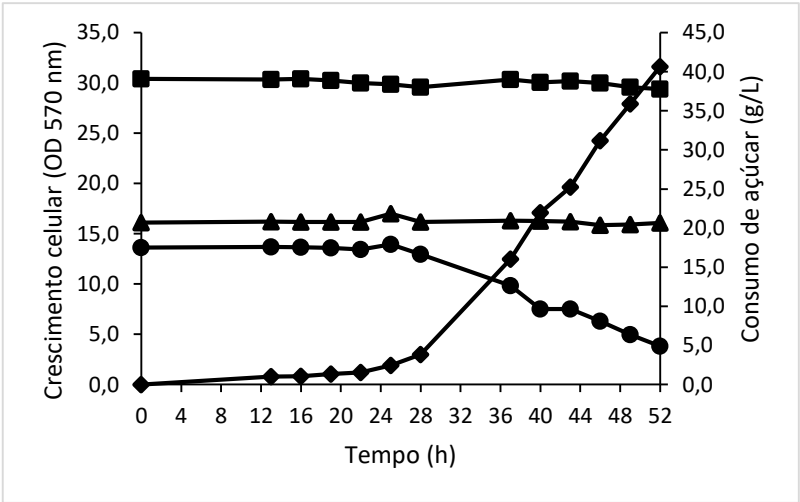
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 7 – Cinética fermentativa da linhagem CHAP-165, biomassa (◆), consumo de açúcares como glicose (●), ramnose (▲) e xilose + manose* (■).



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8 – Cinética fermentativa da linhagem CHAP-206, biomassa (◆), consumo de açúcares como glicose (●), ramnose (▲) e xilose + manose* (■).



Fonte: Elaborada pela autora

Os dados apresentados nas figuras 6 a 8 demonstram ausência de fermentação alcoólica, decorrente provavalmente da baixa velocidade em que as células consumiram os carboidratos. De fato, nosso grupo já demonstrou que diante de transportadores de açúcares ineficientes, o metabolismo celular é preferencialmenterespiratório (DUVAL et al., 2010). Ademais, como já mencionado, o ácido acético (2,5 g/L) é reconhecidamente um inibidor da fermentação alcoólica, levando as células a depender da cadeia respeiratória. Assim, as linhagens foram incapazes de consumir os açúcares xilose, manose e ramnose durante as 52 h de ensaio. A glicose também não foi cosumida por completo (consumo máximo de 12 g/L) (figuras 6 a 8).

Conforme verificado por Lin et al. (2012), para *Saccharomyces cerevisiae* o pH ótimo para a fermentação fica entre 4,0 e 5,0, sendo que valores elevados reduzem a produção de

etanol e priorizam a respiração celular. Martini (2014) aponta que os valores de pH ideais dependem tanto do tipo de microorganismo fermentador quanto da condição de cultivo imposta. Assim, as linhagens selvagens testadas podem ter tendências semelhantes as de *S. cerevisiae*. As nossas cinéticas de fermentação foram realizadas com pH 8, a partir do que verificamos com o DCC para crescimento celular. Contudo, este pH alcalino pode ter representado um impeditivo para a produção de etanol.

A hipótese de estresse osmótico também pode ser sustentada pelo glicerol produzido pelas células durante a cinética (Tabela 3). Estruch (2000) e Mager e Siderius (2002) demonstram que células expostas a condições de estresse sintetizam o glicerol para proteger suas estruturas celulares. A quantidade de xilitol também foi inferior ao que se tem observado para leveduras selvagens (CADETE; ROSA, 2018; TRICHEZ *et al.*, 2019), em virtude do quase nulo consumo de xilose.

Tabela 3 - Valores máximos (g/L) de etanol, xilitol e glicerol gerados durante a cinética fermentativa para as linhagens CHAP-164, CHAP-165 e CHAP-206

Linhagens	Valores máximos (g/L)		
	Etanol	Xilitol	Glicerol
CHAP-164	0	0,44	0,40
CHAP-165	0	0,27	0,57
CHAP-206	0,67	0,42	0,61

Fonte: Elaborada pela autora

4 CONCLUSÕES

A triagem inicial revelou que todas as 46 linhagens conseguiram metabolizar glicose e xilose, com destaque para 13 linhagens que apresentaram um crescimento celular bem expressivo.

Conforme mostrado no DCC, a preferência das linhagens por valores de pH mais alcalinos (pH 8,0) e temperatura mais baixas (15 °C) evidencia o efeito nocivo do ácido acético e o comportamento psicrófilo das leveduras testadas.

Embora as linhagens selecionadas não tenham apresentado o desempenho esperado (maior consumo de açúcares e produção de etanol) nas condições impostas pela cinética fermentativa, os ensaios realizados permitiram conhecer mais sobre o metabolismo dessas linhagens selvagens isoladas da microbiota intestinal de lagartas.

REFERÊNCIAS

ADEN, A. Water usage for current and future ethanol production", Southwest Hydrology. v. 6(5), p. 22-23, 2007. Disponível em: <http://www.swhydro.arizona.edu/archive/V6_N5/feature4.pdf>. Acesso em: 07 out. 2021.

ALI, S. S. et al. Screening and construction of a novel microbial consortium SSA-6 enriched from the gut symbionts of wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* and its biomass-based biorefineries. **Fuel**. v. 236, p. 1128–1145, 2018.

ALVES, S. L. Jr. et al. Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. **Industrial Biotechnology**. v. 15, p. 336-349, 2019.

ALVES, S. L. Jr., MÜLLER C, CAMARGO A. F, et al. Bioprospecting enzymes for 2G ethanol through metagenomics. In: Treichel H, Alves S L Jr, Fongaro G, Müller C (eds) Ethanol as a green alternative fuel: insight and perspectives, 1st edn. **Nova Science Publishers**, Hauppauge, NY,pp 179–201, 2019b.

ALVES JR., S. L. *et al.* Maltose and maltotriose active transport and fermentation by Saccharomyces cerevisiae. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, [*s. l.*], v. 65, n. 2, p. 99–104, 2007.

ANTUNES, F. A. F. et al. Multi scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1343-1355, 2021.

BARRETTO, D. A. et al. Blastobotrys bombycis sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast isolated from the gut of the silkworm larva Bombyx mori. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 68, p. 2638-2643, 2018.

BARROS, E. et al. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 137, p. 237-245, 2010.

BETLEJ, G. *et al.* Long-Term Adaption to High Osmotic Stress as a Tool for Improving Enological Characteristics in Industrial Wine Yeast. **Genes**, [*s. l.*], v. 11, n. 5, 2020. Available at: https://doi.org/10.3390/GENES11050576. Acesso em: 8 out. 2021.

BONATTO, C. *et al.* Experimental data and modelling of 2G ethanol production by Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2. **Renewable Energy**, [*s. l.*], v. 145, p. 2445–2450, 2019. Available at: https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.010

CADETE, R. M. et al. Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoinensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**. v. 123, p. 1203-1213, 2017.

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus Spathaspora: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, [*s. l.*], v. 35, n. 2, p. 191–199, 2018. Available at: https://doi.org/10.1002/yea.3279

CARNEIRO, C. V. G. C.; SILVA, F. C. P.; ALMEIDA, J. R. M. Xylitol production: identification and comparison of new producing yeasts. Microorganisms v. 7, p. 484, 2019.

CASEY, E. et al. Effect ofacetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Res**. v. 10, p. 385-393, 2010.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento** (2020). País confirma recorde na produção de etanol: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20>. Acesso em: 06 set. 2021.

COSTA, J. A. V; de MORAIS M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 2-9, 2011.

CHORMULE, A. et al. First report of the fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae) on sugarcane and other crops from Maharashtra, India. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v. 7, p. 114-117, 2019.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Pragas da fase vegetativa e reprodutiva**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/prvegetativa. htm>. Acesso em: 19 set. 2021.

DU, C. et al. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by Kluyvermomyces marxianus CICC 1727-5 and Spathaspora passalidarum ATCC MYA-4345. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 2845-2855, 2019.

DUVAL, E. H. et al. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy 52 number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 248-259, 2010.

ELIODÓRIO, K. P. et al. Chapter Three - Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. **Advances in Applied Microbiology**. v. 109, p. 61-119, 2019.

EMBRAPA (2015) **Controle biológico aplicado e natural da lagarta-do-cartucho do milho**. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/747861/1/controlebiologicolagarta.pdf>. Acesso em: 21 set. 2021.

EMBRAPA – Revista Agroenergia (2016) **Microalgas**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/Agroenergia-Revista-microalgas-ed10-red.pdf>. Acesso em: 06 set. 2021.

GREETHAM D, ZAKY A, MAKANJUOLA O, DU C. A Brief review on bioethanol production using marine biomass, marine microorganism and seawater. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. v. 14, p. 53-59, 2018.

HILOIDHARI, M. *et al.* Life cycle energy–carbon–water footprints of sugar, ethanol and electricity from sugarcane. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 330, p. 125012, 2021. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125012. Acesso em: 8 out. 2021.

INDIRA, T. et al. Investigation on the production of bioethanol from black tea waste biomass in the seawater-based system. **Bioresource Technology Reports**, v. 4, p. 209–213, 2018.

LEE, W. H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular ß-glucosidase. **Journal of Biotechnology**. v. 67, p. 316-322, 2013.

LEWINSOHN, T. M.; JORGE, L. R; PRADO, P. I. Biodiversidade e interações entre insetos herbívoros e plantas. **DEL CLARO, K.; SILINGARDI, HMT Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Rio de Janeiro**, p. 275-289, 2012.

LI, X.; WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal.** v.54, p.569-581, 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476864 >. Acesso em: 28 Set 2021.

LIN, Y. et al. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 395–401, 2012. MARTINI, C. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 121 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências de Rio Claro, São Paulo, 2014.

MILANO, Heloíze de Souza. **Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana de açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol**. 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MURALI, G.; SHASTRI, Y. Life-cycle assessment-based comparison of different lignocellulosic ethanol production routes. **Biofuels**, [*s. l.*], p. 1–11, 2019. Available at: https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1670465. Acesso em: 8 out. 2021.

OLIVEIRA, P. H. S. **Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono.** 2014. 125 p. Dissertação (Mestrado - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química) – Escola Politécnica, São Paulo, 2014.

PROMIP. **Manejo integrado da *Spodoptera frugiperda* no milho**. Disponível em: <https://www.promip.agr.br/o-manejo-integrado-da-spodoptera-frugiperda-no-milho>. Acesso em: 18 set. 2021.

ROLIM, Adrian Augusto Sosa Gomez. **Microbiota intestinal e assinatura isotópica de adultos de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como marcadores para a identificação da fonte alimentar de imaturos**. 2014. 68 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2014.

RFA - **Renewable Fuels Association** (2019). World fuel ethanol production. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>. Acesso em: 06 set. 2021.

SANTOS, A. A. et al. Microwell plate based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 20, e201511, 2017.

SARMENTO, R. A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**. v.18, n.2, p. 41-48, dez. 2002.

SENATHAM, S. Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. **Springer Plus**, v. 5, p.1040, 2016.

SPERANDIO, Eugenio Miranda. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2012.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 67, p. 918-926, 2008.

TRICHEZ, D. *et al.* Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts Spathaspora sp. JA1 and Meyerozyma caribbica JA9 reveal insights into xylitol production. **FEMS Yeast Research**, [*s. l.*], v. 19, n. 4, 2019. Available at: https://doi.org/10.1093/femsyr/foz034. Acesso em: 6 jun. 2021.