

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

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS E β -GLICOSIDÍDICAS DE
LEVEDURAS PARA O APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS VEGETAIS E A
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS**

ANDERSON GIEHL

ORIENTADOR(a) Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.

Agosto – 2022

ANDERSON GIEHL

Avaliação de atividades celulolíticas e β -glicosídicas de leveduras para o aproveitamento de resíduos vegetais e produção de compostos orgânicos voláteis

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: 24/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR
Data: 25/08/2022 05:42:47-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS

Documento assinado digitalmente
 GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI
Data: 25/08/2022 18:47:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli - UFFS

Documento assinado digitalmente
 JOAO PAULO BENDER
Data: 25/08/2022 09:42:03-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. João Paulo Bender - UFFS

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS E β -GLICOSIDÍDICAS DE LEVEDURAS PARA O APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS VEGETAIS E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Anderson Giehl^{1*}, Sérgio Luiz Alves Jr.²

RESUMO

Considerando a geração estimada em 712 milhões de toneladas de resíduos de milho e cana-de-açúcar no Brasil em 2022, é necessário o constante aperfeiçoamento dos processos de hidrólise e fermentação dessas biomassas para evitar seu subaproveitamento ou descarte inadequado. Nesse sentido, a prospecção de leveduras associadas a insetos herbívoros é interessante, pois estas se encontram em ambientes onde são constantemente submetidas a esse tipo de biomassa. Como parte da microbiota desses invertebrados, elas oferecem enzimas, como a celulase e a β -glicosidase, que contribuem com a digestão do animal. Assim, nessa relação mutualista, as enzimas microbianas hidrolisam hemicelulose e celulose, polissacarídeos que devem ser também hidrolisados para o aproveitamento dos resíduos em questão. Diferentemente das celulases, as β -glicosidases não apenas servem para a redução dos dissacarídeos provenientes da celulose, mas também para a produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) a partir de β -glicosídeos cujas agliconas tenham caráter aromático. Em vista disso, o presente estudo se propôs a avaliar as atividades celulolíticas e β -glicosidáticas de 46 linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo da lagarta do cartucho, além de identificar os VOCs produzidos por elas. Para a avaliação da atividade celulase, as linhagens foram submetidas a meios ricos líquidos contendo carboximetilcelulose (CMC) por um período de 4 dias, e para as avaliações da atividade β -glicosidática e de produção de VOCs, as linhagens foram cultivadas em meios ricos com celobiose por 2 e 3 dias, respectivamente. Por fim, as reações enzimáticas foram analisadas em duas temperaturas: 50 °C e 30 °C. Os sobrenadantes oriundos dos meios contendo CMC foram analisados pelo método de detecção de açúcares redutores com o agente colorimétrico DNS e os sobrenadantes dos cultivos em celobiose, avaliados pela reação com a enzima glicose oxidase de um *kit* comercial (Gold Analisa). Para a análise de VOCs, os sobrenadantes passaram por uma extração líquido-líquido com diclorometano e foram subsequentemente submetidos à análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). Das linhagens testadas, 15 apresentaram atividade celulase e 4, atividade de β -glicosidase. À temperatura de 50 °C, detectou-se um maior número de linhagens com atividade celulolítica, enquanto a 30 °C as linhagens CHAP-184 e CHAP-187 se sobressairam. Para a β -glicosidase extracelular, a CHAP-159 apresentou o melhor desempenho, em 50 °C. No que se refere ao perfil de VOCs, foram detectados 8 compostos, sendo o 2-fenil-etanol, das linhagens CHAP-167 e CHAP-196, aquele com maior potencial de aproveitamento, com base nas áreas de pico dos cromatogramas. A prospecção realizada demonstra que as leveduras analisadas podem contribuir com o aproveitamento de resíduos na geração de produtos biotecnológicos de valor agregado.

Palavras-chave: VOCs, celulase, β -glicosidase, biorefinaria, leveduras associadas a insetos

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola no Brasil até 2017 ocupava 9% da área total do país (MIRANDA, 2017) com diversos tipos de culturas ao longo de sua extensão, sendo algumas das principais o milho, o arroz, a cana-de-açúcar e a soja, que atualmente alcançam um total de área colhida de 57.350.797 hectares juntas. Junto a essas commodities vale ainda ressaltar a silvicultura, que no ano de 2019 teve uma produção de 130.957.918 m³ de madeira em tora (IBGE, 2017,

¹ Discente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, SC, Brasil. *andergiehl@gmail.com

² Docente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, SC, Brasil.

2020). Diante disso, a colheita de cana-de-açúcar, por exemplo, tem uma produção estimada para a safra 2022-2023 de 596,066 milhões de toneladas (CONAB, 2022b), gerando assim um total de 160,937 milhões de toneladas de resíduos. O milho, tem uma colheita estimada, na safra de 2021-2022, de 115,662 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2022^a; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), conseqüentemente gerando cerca de 115,662 milhões de toneladas de resíduos (GRAHAM *et al.*, 2007). Desse modo, há grande geração de resíduos vegetais como bagaços, cascas, palhas, entre outros, que são ricos em materiais lignocelulósicos, compostos por lignina, hemicelulose e celulose.

Essa biomassa lignocelulósica é rica em pentoses e hexoses, que podem ser consumidas por leveduras, servindo como substrato para produção de etanol de segunda geração (2G) e outros bioprodutos de valor agregado em biorrefinarias (ELIODÓRIO *et al.*, 2019; STAMBUK *et al.*, 2008). Contudo, para que essas leveduras tenham acesso a esses carboidratos, é necessária a realização de um pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, visando a obtenção de um hidrolisado que permita a ação metabólica das leveduras no consumo das hexoses e pentoses (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Nesse sentido, há a necessidade do emprego de enzimas como a celulase e a hemicelulase, que reduzem os polímeros de celulose e hemicelulose, provenientes da lignocelulose, a oligômeros e monômeros de glicose e xilose durante o processo da hidrólise. O que genericamente se denomina celulase é na verdade um complexo de enzimas que age sobre a celulose, reduzindo-a a glicose. Nesse complexo estão presentes a endoglucanase, a exoglucanase e a β -glicosidase, cada uma com sua especificidade. A endoglucanase e a exoglucanase reduzem a celulose à celo-oligossacarídeos como a celobiose (um dissacarídeo) ao romperem as ligações β -1-4 presentes do polímero. Enquanto a endoglucanase atua nas porções localizadas no meio da molécula, a exoglucanase age nas pontas. Por fim, as moléculas de celobiose assim liberadas são então hidrolisadas pela β -glicosidase a monômeros de glicose (SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

As β -glicosidases, no entanto, não são unicamente responsáveis por hidrolisar moléculas de celobiose. Essas enzimas podem também hidrolisar β -glicosídeos presentes em material vegetal, gerando assim compostos orgânicos voláteis (VOCs) que compunham a porção aglicona nesses glicosídeos (HJELMELAND; EBELER, 2015). Tais VOCs são uma gama de substâncias que envolvem hidrocarbonetos de cadeias pequenas, ácidos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos, tiois, aromáticos e derivados, possuindo variada volatilidade e lipofilicidade e baixas pressões de vapor (ANAND; MEHENDALE, 2005; PENNERMAN *et al.*, 2016). As leveduras são naturalmente capazes de produzir esses

compostos, tendo papel na polinização, estimulando ou interrompendo o crescimento de plantas, na comunicação entre- e intra-espécie e na inibição de organismos competidores (BOGO *et al.*, 2021; MEDINA-ROMERO; ROQUE-FLORES; MACÍAS-RUBALCAVA, 2017).

Diante esse contexto, a produção de VOCs a partir de substratos provenientes de resíduos lignocelulósicos, por leveduras em seus processos metabólicos, se torna interessante. Uma vez que muitos desses compostos já identificados possuem alto valor agregado e servem como moléculas plataformas em diversos setores industriais — como é o caso do ácido acético que em 2019 teve seu mercado avaliado em 8,92 bilhões de dólares, com uma estimativa de crescimento de mercado anual de 5,2% até 2027 (GVR, 2022), torna-se importante buscar micro-organismos capazes de produzir enzimas e compostos voláteis, de modo a propiciar o barateamento dos seus custos de produção. Ademais, estudos nesse sentido tendem a caracterizar novos micro-organismos capazes de atuar em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), considerando-se o contexto de biorrefinaria multiproduto de segunda-geração (2G). Nesse caso, o resíduo vegetal é empregado como matéria-prima não apenas na produção de etanol 2G, mas também (senão especialmente) na geração de bioprodutos provenientes do metabolismo de leveduras (CONTARINO *et al.*, 2019; QADIR *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2016).

Em vista do acima exposto, prospectar leveduras em locais como o trato digestivo de insetos, como a lagarta *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho), pode auxiliar na busca por melhores enzimas ou por cepas que possam ser empregadas na produção desses bioprodutos. Diante disso, o presente trabalho se propôs a avaliar as atividades celulolíticas e β -glicosidídicas de 46 linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo da lagarta do cartucho, bem como a caracterizar os VOCs produzidos por elas. Deste modo, espera-se contribuir para o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas residuais e para a produção de bioprodutos de valor agregado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LEVEDURAS UTILIZADAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas 46 cepas selvagens, previamente isoladas pelo grupo do Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul (TADIOTO, 2022), Campus Chapecó-SC, provenientes do trato digestivo de larvas de *Spodoptera frugiperda*. As

cepas são identificadas pelo prefixo CHAP e numeradas conforme a ordem numérica das cepas da coleção do grupo.

Durante os experimentos, as cepas foram aclimatadas a 30 °C em um meio de pré-cultivo YP (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar. Após 72 h, com uma alça graduada de inoculação, transferiu-se 1 µL do meio de pré-cultivo para os meios distintos de cada experimento (conforme descrito abaixo).

Para a atividade celulolítica, foram utilizados meios de cultivo YP contendo 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC). Os frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL do meio descrito foram mantidos a 30 °C sob agitação de 145 rpm. Após 96 h de incubação, transferiu-se 1 mL do meio de cada cultivo para microtubos que foram centrifugados por 5 min a 5000 rpm. Os sobrenadantes coletados foram transferidos para novos microtubos e posteriormente utilizados para a análise da atividade celulase.

Para a atividade β-glicosídica, as células foram cultivadas em meios YP contendo 20 g/L de celobiose, sob agitação de 145 rpm e temperatura de 30 °C. Após 48 h de incubação, 2 mL do meio de cultivo foram transferidos para microtubos a serem centrifugados por 5 min a 5000 rpm. Os sobrenadantes foram coletados para a análise do consumo de celobiose e da atividade β-glicosidase.

Por fim, para a determinação dos VOCs, as células foram cultivadas por 72 h a 30 °C e 145 rpm em YP com 20 g/L de celobiose. Posteriormente, transferiu-se o meio de cultura para tubos Falcon que foram centrifugados a 9000 rpm por 5 min. Do sobrenadante proveniente da centrifugação, foi coletado 20 mL e adicionado a 6,67 mL de diclorometano (1/3 v). A mistura foi agitada por 30 min a 145 rpm a temperatura ambiente e, com o auxílio de um funil de separação, realizou-se uma extração líquido-líquido seguindo uma adaptação feita de ROQUE *et al.* (2019), em que a fase contendo diclorometano foi coletada e enviada para um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) — vide seção 2.5.

2.2 ATIVIDADE CELULASE

O ensaio da atividade celulolítica foi realizado com protocolo adaptado de KIM *et al.* (2014). Brevemente, 10 µL de sobrenadante coletado de cada crescimento celular em CMC (conforme descrito em 2.1) foram transferidos para microplacas de 96 poços (cada amostra foi avaliada em triplicata). Como controle negativo, foram utilizados 10 µL do mesmo meio de cultura com CMC, porém estéril (não inoculado). Na sequência, foram adicionados, a cada

poço da microplaca, 15 µL de Tampão 0,15 M Succinato-Tris contendo 10 g/L de CMC (pH 5,0), de modo a induzir as enzimas presentes no sobrenadante coletado a hidrolisarem o CMC à glicose. A reação ocorreu com a placa selada por um período de 1h em banhos-maria ultratermostatizados sob temperatura constante de 50 °C e 30 °C, a fim de observar o efeito da temperatura sob a atividade enzimática.

Após a incubação, o protocolo de determinação de açúcares redutores descrito por SANTOS *et al.* (2017) foi utilizado para a quantificação da glicose (produto da reação enzimática) presente nos poços. Para isso, uma curva de calibração foi preparada adicionando-se a novos poços concentrações crescentes de glicose (0 a 2 g/L). Em seguida, 25 µL de DNS (1% ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30% tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4M de NaOH) foram adicionados a todos os poços (contendo as amostras, o controle negativo e a curva padrão). A placa foi novamente selada e, dessa vez, incubada por 5 min a 100 °C para a reação com o DNS. Posteriormente, 330 µL de água destilada foram adicionados a cada poço, e a leitura da absorbância foi imediatamente realizada em um leitor de microplaca sob o comprimento de onda de 490 nm. Com base na quantidade de glicose presente nos poços, estimou-se a atividade relativa da enzima de acordo com o cálculo abaixo:

$$Atividade\ enzimática\ (nmol\ Glicose/mL\ min) = \frac{1000000}{60} \times \frac{C_{glicose}}{MM_{glicose}}$$

onde,

$C_{glicose}$ – Concentração de glicose (g/L) presente na amostra

$MM_{glicose}$ – Massa molar da glicose (180,156 gmol)

Sendo assim, uma unidade de atividade enzimática (U) definida ao quanto de CMC foi hidrolisada a 1 nmol de glicose por min.

2.3 ATIVIDADE β-GLICOSIDASE EXTRACELULAR

Para analisar a atividade das β-glicosidases extracelulares presentes nos sobrenadantes coletados durante os cultivos em meios com celobiose (conforme descrito na seção 2.1), 10 µL de cada sobrenadante foram adicionados a 15 µL de Tampão 0,15M de Succinato-Tris contendo 10 g/L de celobiose (pH 5,0). A fim de proporcionar a hidrólise do dissacarídeo, os microtubos foram incubados por 1 h em banhos-maria ultratermostatizados sob temperatura constante de 50 °C ou 30 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Após a incubação, 1 mL do reagente de cor do kit enzimático comercial Gold Analisa foi adicionado a cada tubo de reação para a determinação da concentração de glicose em cada amostra (conforme protocolo do fabricante, o cálculo da concentração de glicose levou em conta a reação de cor com o padrão do kit). As amostras foram então adicionalmente incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos e subsequentemente analisadas em espectrofotômetro com feixe de luz de 505 nm. A atividade enzimática extracelular foi estimada pela equação apresentada na seção 2.2, sendo assim, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida ao quanto de celobiose foi hidrolisada a 1 nmol de glicose por min.

2.4 DOSAGEM DE CELOBIOSE

A fim de avaliar o consumo de celobiose durante os cultivos celulares, os sobrenadantes coletados após 48 h de incubação foram submetidos à reação com DNS, conforme descrito por SANTOS *et al.* (2017). Para isso, 25 µL de amostra foram misturados a 25 µL de DNS e incubados por 5 min a 100 °C. Após incubação, adicionaram-se 330 µL de água destilada, e a absorbância foi medida a 490 nm. O consumo de celobiose foi calculado pela relação:

$$\text{Consumo de Celobiose}(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

onde,

Cf – Concentração de celobiose da amostra (g/L)

Ci – Concentração de celobiose do meio de cultura estéril coletado antes do inóculo (g/L)

2.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

As amostras oriundas da fase imiscível da extração líquido-líquido em diclorometano foram submetidas à cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010Ultra (Shimadzu). Foram injetados 2 µL de amostra em uma coluna capilar NST05ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) e fase móvel de gás hélio, com fluxo total de 14 mL/min; com temperatura do injetor de 150 °C, split 1:10, programação de temperatura do forno de 100 °C por 6 minutos, 100 °C a 150°C com taxa de 4 °C/min, 150 °C a 220°C com taxa de 8°/min e 220 °C até 40 minutos. O espectrômetro de massas operou com temperatura da fonte de ionização de 200 °C e da interface de 220 °C, modo de escaneamento (m/z) 35 -

500. A biblioteca utilizada foi para a análise do espectro de massas foi a NIST08s Os resultados foram expressos em relatórios, com limite definido de 50 picos, que apresentavam a área respectiva desses picos para os compostos que apresentaram tempo de retenção na coluna. Avaliou-se também a diferença dos compostos em relação ao extrativo do meio de cultura prévio ao inóculo.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando o software GarphPad Prism® v8.0.2 (StatSoft Inc), em que os resultados das análises de atividade enzimática foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e a um teste de Tuckey, com aceitação de 95% ($p < 0,05$). Para as linhagens que mostraram ser diferentes estatisticamente, em relação aos controles negativos (meio de cultura), foram atribuídos símbolos (*) indicando. Também, a partir de um teste-t, comparou-se os resultados obtidos entre as mesmas linhagens para as diferentes temperaturas. Os dados foram apresentados em figuras sendo exibidos as médias e as barras de desvio padrão (1σ).

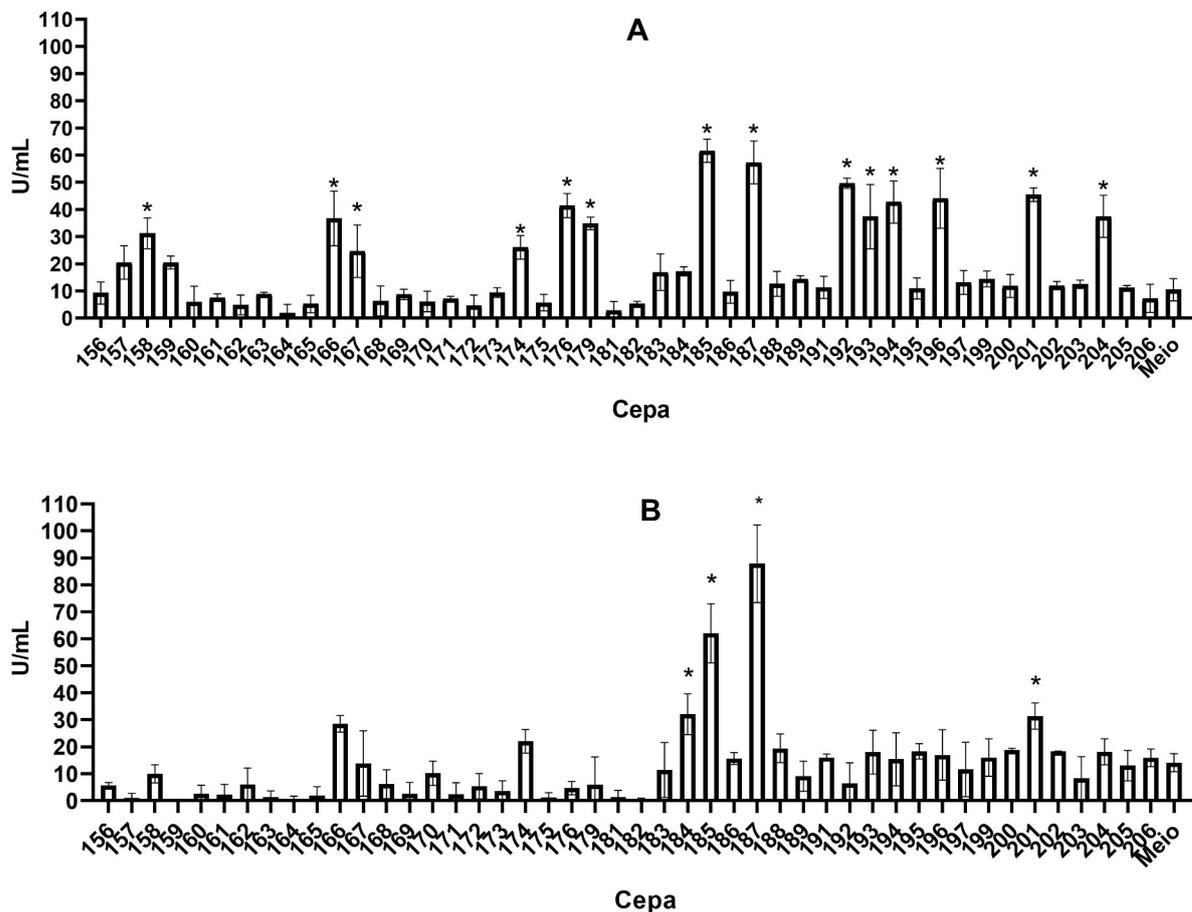
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE CELULASE

No intuito de analisar a atividade celulolítica das linhagens e avaliar o efeito da temperatura sobre tal atividade, os sobrenadantes provenientes do cultivo em meios contendo CMC foram adicionados a um tampão contendo 1% de CMC e incubados, alternadamente, a 50 °C e 30 °C. Das 46 linhagens avaliadas, 14 mostraram diferença significativa em relação ao controle negativo (meio de cultura) em 50 °C. Já na reação a 30 °C, este número foi de apenas quatro linhagens (Figura 1).

O número de linhagens positivas para atividade celulolítica difere do que foi observado por TADIOTO (2022), que avaliou as mesmas linhagens em um teste qualitativo baseado em halos apresentados em placas de Petri após reação com o corante Vermelho Congo. Naquele trabalho, 30 linhagens se mostraram positivas para a produção de celulases. Outra diferença notada foi que, para as cepas CHAP-174, CHAP-185, CHAP-187, CHAP-193 e CHAP-196, TADIOTO (2022), em seu teste, não detectou atividades, diferentemente do que agora observamos.

Figura 1 – Análise da atividade celulolítica em 50 °C (A) e 30 °C(B). Asterisco (*) indicam diferenças significativas entre cepas testadas quanto à atividade celulase referente ao controle (meio). 1 U = 1 nmol de glicose/mL



Fonte: autor (2022)

No que se refere ao efeito da temperatura, observou-se que as cepas CHAP-184 e CHAP-187 apresentaram atividades maiores em 30 °C do que em 50 °C ($p < 0.05$), com valores de $32,09 \pm 7,56$ U/mL e $87,88 \pm 14,40$ U/mL em comparação a $17,25 \pm 1,67$ U/mL e $57,35 \pm 7,91$ U/mL, respectivamente. Esses dados se mostram interessantes para processos de SSF, cuja temperatura deve atender à faixa ideal do microrganismo fermentador. Para as demais linhagens, a temperatura de 50 °C mostrou maiores valores de atividade, corroborando os resultados encontrados normalmente na literatura, em que a melhor faixa de atividade celulolítica se encontra entre 45 e 60 °C (FARINAS *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2009).

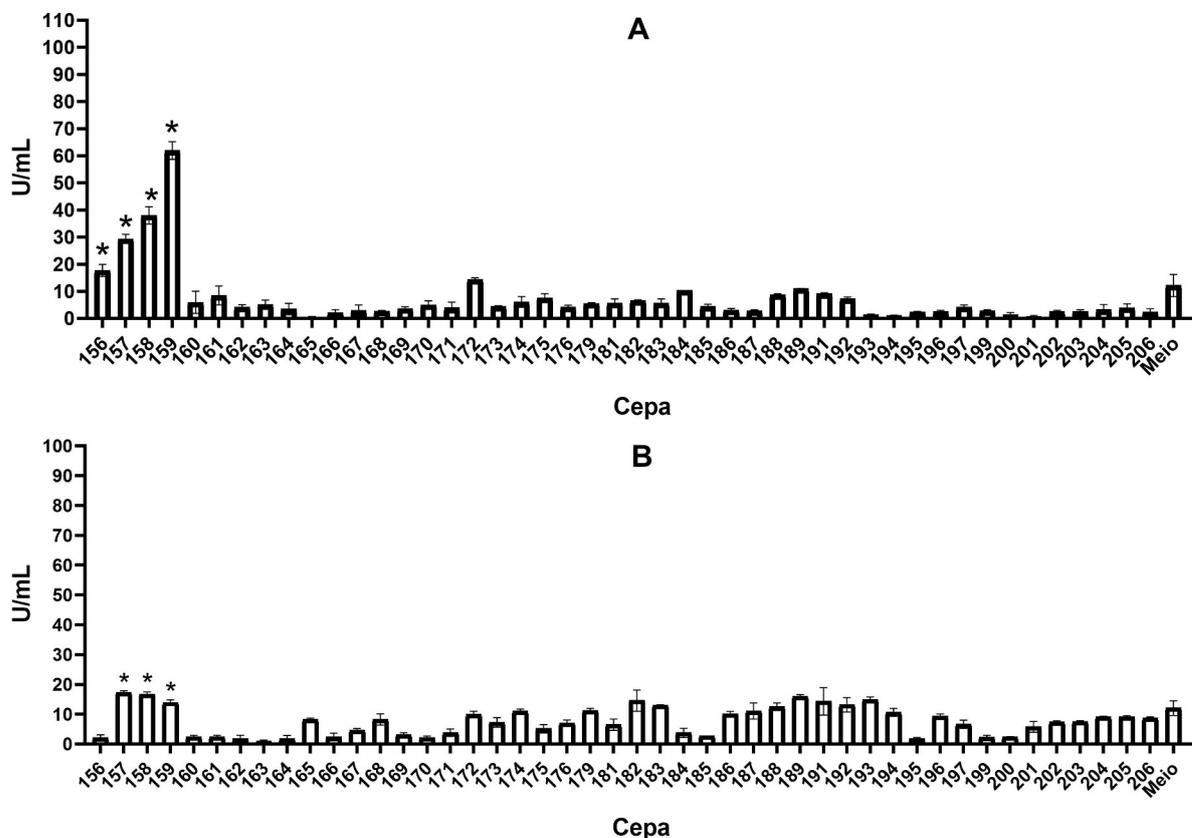
A maioria dos estudos e processos atuais empregam enzimas purificadas de fungos filamentosos. Nesse sentido, em trabalhos que utilizaram leveduras oleaginosas como o de

VYAS & CHHABRA (2017), encontram-se valores de atividade celulase semelhante aos nossos resultados, estando na faixa de $72,0 \pm 13,0$ U/mL e $40,0 \pm 0,6$ U/mL para endoglucanase e exoglucanase.

3.2 ATIVIDADE β -GLICOSIDASE E CONSUMO DE CELOBIOSE

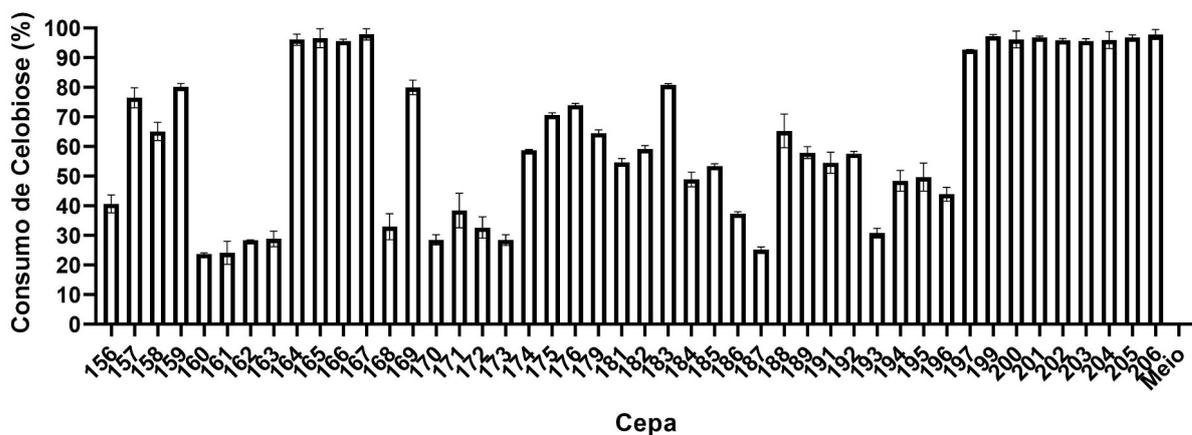
Para a avaliação da atividade β -glicosídica, os sobrenadantes provenientes do cultivo em celobiose foram submetidos a reação em tampão contendo 1% desse dissacarídeo em temperaturas de 50 °C e 30 °C. Das 46 linhagens avaliadas, apenas quatro apresentaram atividade β -glicosidase extracelular estatisticamente significativas: CHAP-157, CHAP-158, CHAP-159 e CHAP-189 (Figura 2). Interessantemente, porém, no que se refere ao consumo da celobiose presente no meio em que as células foram cultivadas, observou-se que 29 cepas consumiram mais da metade dos 20 g/L iniciais (Figura 3), indicando, assim, que mesmo a maioria não demonstrando atividade extracelular, apresentam enzimas que atuam no periplasma ou no interior da célula. De fato, significativa parcela das leveduras tende a apresentar um transportador de celobiose na membrana plasmática da célula e uma hidrolase citoplasmática para garantir a metabolização da celobiose (BARRILLI et al., 2020).

Figura 2 – Análise da atividade β -glicosidídica em 50 °C (A) e 30 °C(B). Asterisco (*) indicam diferenças significativas entre cepas testadas quanto à atividade celulase referente ao controle (meio). 1 U = 1 nmol de glicose/mL



Fonte: autor (2022)

Figura 3 – Consumo de celobiose (%), presente no meio de cultura após 48h, pelas linhagens



Fonte: autor (2022)

A temperatura de 50°C propiciou a maior atuação das enzimas. As atividades observadas foram de $29,35 \pm 1,65$ U/mL, $37,98 \pm 3,16$ U/mL e $61,92 \pm 3,23$ U/mL pelas respectivas linhagens CHAP-157, CHAP-158, CHAP-159, sendo significativamente maiores

do que essas cepas apresentaram em 30 °C ($p < 0,05$). Em contrapartida, a linhagem CHAP-189 apresentou $15,89 \pm 0,72$ U/mL unicamente em 30 °C. Analisando uma linhagem de *Pseudozyma brasiliensis*, KAUPERT NETO *et al.* (2016) encontraram atividades extracelulares inferiores a 10 U/mL. Do mesmo modo GAO *et al.* (2022), em testes com *Meyerozyma guilliermondii* NM218 e *Hanseniaspora uvarum* BF345, em meios similares a mostos de fermentação de vinho, também obtiveram atividades inferiores às que observamos, variando de 4,8 a 5,4 U/mL. Vale mencionar ainda que os mesmos testes feitos por FARINAS *et al.* (2010) também mostraram maiores rendimentos das β -glicosidases a uma temperatura de 55°C, similar a testada nos ensaios aqui realizados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE VOCS

Os extrativos oriundos da extração líquido-líquido dos sobrenadantes coletados do meio de cultura foram submetidos ao GC-MS. Das 46 linhagens, foram analisados os extrativos de 23 e também do meio de cultivo antes da inoculação. Em razão de o meio de cultivo ser composto por peptona e extrato de levedura, e de os extrativos conterem moléculas residuais de células mortas, as detecções de compostos alcanos, como dodecano, tetradecano e nonano (oriundos de ácidos graxos), aminoácidos, como L-leucina e L-prolina, e alguns outros compostos, como o pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, foram desconsideradas, ou seja, não contaram como resultados provenientes do metabolismo das linhagens avaliadas.

Dentre os VOCs detectados pelo GC-MS, destacam-se os compostos apresentados na Tabela 1, sendo o 2-fenil-etanol, o fenol e o ácido acético os com maior frequência de aparição, detectados em respectivamente 21, 13 e 10 cepas. Haja vista o fato de o meio de cultura ser menos complexo que um hidrolisado e a coluna utilizada não detectar todas as classes de VOCs, o número de compostos voláteis aqui analisados foi menor do que se observa na literatura. Ademais, cabe ressaltar a baixa diversidade de glicosídeos presentes na amostra, uma vez que, pelo caráter dos compostos encontrados, alguns são derivados de processos metabólicos de intermediários da via glicolítica (ácido acético), de compostos provenientes do triptofano (indol) e de glicosídeos com grupos aromáticos (demais). De todo modo, a influência da β -glicosidase no perfil expresso é relevante, uma vez que, para diversos estudos que avaliaram substratos provenientes da produção de chás, vinhos e cervejas, visando o aprimoramento dos aromas a partir da hidrólise utilizando a referida enzima, verificou-se também a presença de ácido acético, 2-fenil-etanol, benzaldeído e ácido

benzóico, porém também um número maior de compostos (ÇELIK; DINÇER; AYDEMIR, 2016; JIANG *et al.*, 2022; NI *et al.*, 2021; SU *et al.*, 2010).

Tabela 1- Compostos orgânicos voláteis produzidos pelas linhagens analisadas

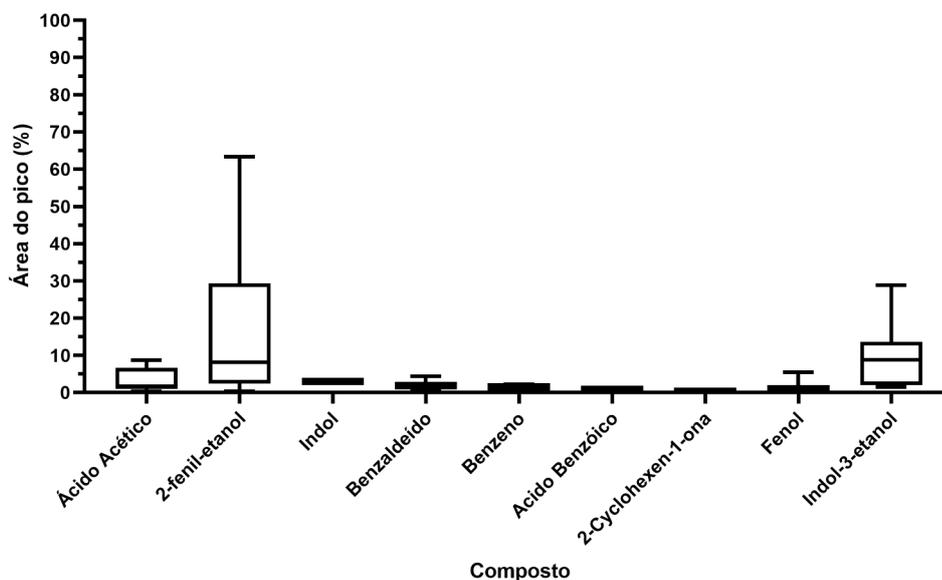
Compostos	Cepas	Usos*
Ácido Acético	169, 170, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 191	Conservante e aditivo de alimentos, produção de fármacos, solvente industrial e laboratorial, entre outros
2-fenil-etanol	158, 160, 161, 163, 164, 165, 167, 169, 170, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 191, 193, 194, 195, 196, 197	Antimicrobiano, anticéptico, desinfetante, essência aromática, conservante de perfumes e fármacos
Indol	158	Componente de fragrâncias e agregador de sabor
Benzaldeído	163, 167, 194	Componente de fármacos, perfumes e produtos de limpeza, e agregador de sabor e odor
Benzeno	167, 193	Molécula plataforma para fármacos, solventes, detergentes, entre outros
Ácido Benzóico	164, 196, 197	Molécula plataforma e conservante de alimentos
2-Cyclohexen-1-ona	167	Agregador de sabor
Fenol	160, 161, 162, 163, 165, 167, 169, 181, 183, 184, 185, 187, 191	Antimicrobiano e molécula plataforma para produção de resinas, fármacos e solventes

*As informações referentes aos usos dos compostos foram retiradas do banco de dados PubChem e podem ser acessadas através do link <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Fonte: autor (2022)

Os compostos ácido acético e 2-fenil-etanol, encontrados em nossas análises, são responsáveis por atrair agentes polinizadores em angiospermas, como as moscas *Drosophila melanogaster*, que buscam o néctar das plantas para se alimentar, permitindo que as leveduras ocupem novos substratos e favorecendo o processo reprodutivo das flores durante essa interação entre as partes (BECHER *et al.*, 2018). Além disso, nossos dados corroboram os achados de LJUNGGREN *et al.* (2019). No estudo desenvolvido por esses autores, leveduras isoladas de solo, flores e insetos ou suas larvas mostraram-se capazes de produzir indol, ácido acético, benzaldeído e 2-fenil-etanol, além de também produzirem VOCs capazes de afetar o comportamento alimentar dos animais mencionados.

Figura 4 – Análise da presença dos VOCs quali-quantitativa das amostras



Fonte: autor (2022)

Foram avaliadas também as áreas dos cromatogramas gerados a partir da cromatografia a gás. De forma quali-quantitativa, essas análises indicam a presença dos compostos na amostra. Os resultados obtidos demonstram que os compostos que mais se destacaram foram o 2-fenil-etanol, Indol-3-etanol, ácido acético e fenol (Figura 4). Para o 2-fenil-etanol, as linhagens que mais demonstraram área de pico nos cromatogramas foram a CHAP-164, CHAP-165, CHAP-167, CHAP-195 e CHAP-196, com áreas respectivas de 63,33%, 50,03%, 51,49%, 37,28% e 45,84%. Em termos de extração, considerando os usos apresentados na Tabela 1, a grande presença desses compostos torna facilmente viável o aproveitamento desse composto a partir da atividade metabólica dessas 5 leveduras.. Para o ácido acético, as cepas CHAP-181, CHAP-183, CHAP-185, CHAP-186 e CHAP 191 apresentaram valores na faixa de 8%. Embora não tenha sido tão expressivo como o 2-fenil-etanol, considerando-se grandes volumes de produção, admite-se a possibilidade de ser aproveitado como produto secundário em biorrefinarias multiprodutos.

Além dos VOCs, o Indol-3-etanol também se mostrou presente nas análises (Figura 4). Tal composto pode ser derivado, por processos metabólicos, a ácido Indol-3-acético (IAA). Cabe salientar que o IAA apresenta importante ação no cultivo de espécies vegetais, pois serve como promotor do alongamento das células, crescimento das raízes e desenvolvimento da planta, servindo como uma auxina (PETKOVA *et al.*, 2022). Assim como o 2-fenil-etanol, o Indol-3-etanol, também apresentou expressivo potencial de aproveitamento. As maiores

áreas de pico nos cromatogramas foram apresentadas pelas linhagens CHAP-194, CHAP-195, CHAP-196 e CHAP-197, com respectivas áreas de 26,55%, 25,63%, 28,85% e 17,53%, podendo ser utilizadas em estudos de cultivos de plantas a fim de ver o benefício da associação dessas leveduras com o desenvolvimento dos vegetais.

Por fim, cabe ressaltar que, mesmo não tendo apresentado atividades enzimáticas que superarem as atualmente empregadas, as leveduras analisadas demonstram potencial para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos em processos SSF e a produção de bioprodutos. Ademais, trabalhos futuros podem investigar as atividades β -glicosídicas intracelular e periplasmática desses microrganismos, pois essas isoenzimas também atuam na quebra de glicosídeos gerando VOCs como os encontrados aqui.

A partir das nossas análises, merecem destaque especial as linhagens CHAP-167 e CHAP-196, que além estarem entre as maiores produtoras de 2-fenil-etanol apresentaram atividade celulase e foram capazes de metabolizar a celobiose (demonstrando a presença de ao menos uma β -glicosidase periplasmática ou citoplasmática em suas células). Vale salientar que o 2-fenil-etanol é um composto amplamente usado como molécula plataforma de diversas indústrias, apresentando um mercado anual de 255,3 milhões de dólares com estimativa de alcançar, até 2028, um faturamento de até 370 milhões de dólares/ano (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2022).

Ademais, a prospecção de leveduras auxilia no aprimoramento de conhecimentos que possibilitam o desenvolvimento do mercado biotecnológico, indicando possíveis fontes para obtenção de enzimas ou produtos oriundos de processos naturais, buscando a substituição ou a redução da utilização de produtos derivados de fontes não renováveis e alcançando os objetivos do desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Agenda de 2030 da ONU (ALVES *et al.*, 2019; GIEHL *et al.*, 2022).

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação de atividades celulolíticas e β -glicosídicas de leveduras isoladas do trato digestivo da lagarta *Spodoptera frugiperda*. Foi observado, dentre as 46 leveduras testadas, 19 linhagens capazes de produzir celulase, sendo a maior atividade observada na temperatura de 30 °C pela cepa CHAP-187 ($87,88 \pm 14,40$ U/mL). Majoritariamente, porém, as cepas apresentaram atividade em 50 °C, tendo atividade reduzida, em maioria, pela redução da temperatura. Perfil semelhante ocorreu para a atividade β -glicosidase extracelular, porém apenas quatro das 46 linhagens apresentaram atividade.

Acerca do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de VOCs, nossos resultados demonstram potencial de parcela das cepas avaliadas. As análises por GC-MS detectaram oito compostos de importância biotecnológica, com destaque para o 2-fenil-etanol.

Por fim, as linhagens CHAP-167 e CHAP-196 apresentam-se como linhagens que são capazes de produzir enzimas e compostos para o aproveitamento de resíduos agrícolas e florestais, demonstrando o potencial biotecnológico de leveduras isoladas associadas a insetos.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, Sérgio L. *Et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 336–349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
- ANAND, S. Satheesh; MEHENDALE, Harihara M. Volatile Organic Compounds (VOC). **Encyclopedia of Toxicology**, [s. l.], p. 450–455, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/01015-2>
- BARRILLI, Évelyn T. *et al.* Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. *Archives of Microbiology*, v. 202, p. 1729-1739, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01884-1>
- BECHER, Paul G. *et al.* Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 2962–2974, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ece3.3905>
- BOGO, Gherardo *et al.* Nectar chemistry is not only a plant's affair: floral visitors affect nectar sugar and amino acid composition. **Oikos**, [s. l.], v. 130, n. 7, p. 1180–1192, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/oik.08176>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- ÇELIK, Akile; DINÇER, Ayşe; AYDEMİR, Tülin. Characterization of β -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 89, p. 406–414, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.008>
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Boletim da Safra 2021**, [s. l.], v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022^a. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/CONAB>. **Conab – Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**. [S. l.], 2022^b. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 27 jul. 2022.
- CONTARINO, Rosaria *et al.* Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.008>. Acesso em: 23 abr. 2022.

DE OLIVEIRA, Raul Alves *et al.* Energy supply design for the integrated production of 1G + 2G ethanol from sugarcane. **Renewable Energy Focus**, [s. l.], v. 35, n. December, p. 171–177, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ref.2020.10.005>

ELIODÓRIO, Kevy Pontes *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. **Advances in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 109, p. 61–119, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2019.10.002>

FARINAS, Cristiane S *et al.* Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 810–815, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.001>

GAO, Pingping *et al.* Indigenous Non-Saccharomyces Yeasts With β -Glucosidase Activity in Sequential Fermentation With *Saccharomyces cerevisiae*: A Strategy to Improve the Volatile Composition and Sensory Characteristics of Wines. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845837>

GIEHL, Anderson *et al.* Production Of Volatile Organic Compounds By Yeasts In Biorefineries: Ecological, Environmental, And Biotechnological Outlooks. **Ciências Ambientais E Da Saúde Na Atualidade: Insights para alcançar os Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável**, [s. l.], p. 64–78, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.56041/9786599841804-4>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **2-Phenylethanol Market Share Statistics 2022-2028**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/2-phenylethanol-market>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GRAHAM, R. L. *et al.* Current and potential U.S. corn stover supplies. **Agronomy Journal**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 1–11, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0222>

GVR. **Acetic Acid Market Size & Share | Industry Report, 2020-2027**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/acetic-acid-market>. Acesso em: 17 ago. 2022.

HJELMELAND, Anna K.; EBELER, Susan E. Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5344/AJEV.2014.14104>. Acesso em: 2 jun. 2022.

IBGE. **Censo Agropecuário – 2017**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html?=&t=downloads>. Acesso em: 7 out. 2021.

IBGE. **Culturas temporárias e permanentes**. [S. l.], 2020. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?utm_source=landing&utm_medium=explica&utm_campaign=producao_agropecuaria&t=resultados. Acesso em: 7 out. 2021.

- JIANG, Qing-xiang *et al.* B-Glucosidase improve the aroma of the tea infusion made from a spray-dried Oolong tea instant. **LWT**, [s. l.], v. 159, p. 113175, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113175>
- JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- KAUPERT NETO, Antonio Adalberto *et al.* Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. f0v117, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/f0v117>
- KIM, Jennifer Jooyoun *et al.* Effective Microwell Plate-Based Screening Method for Microbes Producing Cellulase and Xylanase and Its Application. **J. Microbiol. Biotechnol.**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1559–1565, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/JMB.1405.05052>. Acesso em: 17 ago. 2022.
- LJUNGGREN, Joel *et al.* Yeast Volatomes Differentially Affect Larval Feeding in an Insect Herbivore. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 85, n. 21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01761-19>. Acesso em: 2 jun. 2022.
- MEDINA-ROMERO, Yoli Mariana; ROQUE-FLORES, Gonzalo; MACÍAS-RUBALCAVA, Martha Lydia. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 22, p. 8209–8222, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>
- MIRANDA, Evaristo Eduardo de. Meio ambiente: a salvação pela lavoura. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 38–44, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21800/2317-66602017000400013>
- NI, Hui *et al.* Enzymatic hydrolysis and auto-isomerization during β -glucosidase treatment improve the aroma of instant white tea infusion. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 342, p. 128565, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128565>
- PENNERMAN, K. K. *et al.* Fungal Volatile Organic Compounds (VOCs) and the Genus *Aspergillus*. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications**, [s. l.], p. 95–115, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00007-5>
- PETKOVA, Mariana *et al.* Tobacco Plant Growth-Promoting and Antifungal Activities of Three Endophytic Yeast Strains. **Plants** 2022, Vol. 11, Page 751, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 751, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PLANTS11060751>. Acesso em: 2 jun. 2022.
- QADIR, Faizan *et al.* Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under solid state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 123, p. 407–415, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.021>

ROQUE, Laerti Reis *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, [s. l.], v. 242, p. 775–787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.130>. Acesso em: 7 abr. 2022.

SANTOS, Angela Alves Dos *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315>

SINGH, Rajesh *et al.* Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 28–35, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2009.08.001>

SRIVASTAVA, Neha *et al.* **Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application**. [S. l.]: MDPI AG, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9060220>

STAMBUK, Boris U. *Et al.* Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 918–926, 2008.

SU, Erzhen *et al.* Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioprocess Processing**, [s. l.], v. 88, n. 2–3, p. 83–89, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2009.04.001>

TADIOTO, Viviani. **Prospecção de celulasas e xilanasas em leveduras isoladas do intestino de lagartas *Spodoptera frugiperda***. 24 f. 2022. - Universidade Federal da Fronteira Sul, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br:8443/handle/prefix/5746>. Acesso em: 17 ago. 2022.

VYAS, Sachin; CHHABRA, Meenu. Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 223, p. 250–258, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.10.039>