

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDA POR
BACTÉRIAS DEPOSITADAS NA COLEÇÃO BACTERIOLÓGICA DO LABORATÓRIO
DE MICROBIOLOGIA-UFAM**

**MANAUS
2012**

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDA POR
BACTÉRIAS DEPOSITADAS NA COLEÇÃO BACTERIOLÓGICA DO LABORATÓRIO
DE MICROBIOLOGIA-UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDA POR *Bacillus*
sp, DEPOSITADAS NA COLEÇÃO BACTERIOLÓGICA DO LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA-UFAM**

Bolsista: Rafael Menezes Valente
Orientador: Raimundo Felipe da Cruz Filho

**MANAUS
2012**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 2.1 Enzimas e aplicação biotecnológica
- 2.2 Mercado mundial de enzimas
- 2.3. Celulose
- 2.4 Hidrólise da celulose
- 2.5 Celulases
- 2.6. Microrganismos celulolíticos
- 2.7 Fermentação submersa
- 2.8 Método do Ácido Dinitrossalicílico
- 2.9 Tendências futuras para produção de celulases
- 2.10 Aplicação de celulases na indústria de alimentos
- 2.11 Purificação de enzimas
- 2.12 Sistema de duas fases aquosas

3. MATERIAL E MÉTODOS

- 3.1 Microrganismo
- 3.2 Identificação bacteriana
- 3.3 Análise qualitativa da produção de celulase
- 3.4 A análise quantitativa da produção de celulase via açúcares redutores
- 3.6 Efeito das diferentes temperaturas na atividade celulolítica
- 3.7 Efeito de diferentes pH na atividade celulolítica
- 3.8 Condições de cultivo para produção de celulase em planejamento fatorial
- 3.9 Preparação do Sistema de Duas fases aquosa
- 3.10 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína, Atividade, Rendimento, Seletividade e Fator de Purificação

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 CONCLUSÃO

6 REFERÊNCIAS

7 CRONOGRAMA

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, constituídas de proteínas produzidas por células vivas que apresentam alta atividade e seletividade específica sobre o substrato. (CALADO et al., 2007). O desenvolvimento de tecnologias que permitam sua produção a um custo competitivo é de grande importância para diversas aplicações biotecnológicas (SOUZA et al., 2010). Enzimas importantes na indústria de alimentos são utilizadas com o intuito de influenciar a composição final do produto melhorando sua qualidade e tornando fácil sua obtenção (LIMA et al, 2001).

A hidrólise da celulose está dividida em três classes: endoglucanases, que atacam a celulose aleatoriamente e quebram as ligações β -1,4-glicosídicas; exoglucanase, que liberam celobiose e/ou glicose das terminações não reduzidas da celulose e celobioases, que hidrolisam a celobiose e dextrinas em glicose (WEGBECHER, 2010).

Estudos têm sido realizados na busca das celulasas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies produtoras dessas enzimas mediante aplicação de métodos de engenharia genética (BUSSAMRA, 2010).

A celulase é utilizada na indústria de alimentos, como na preparação do malte da cerveja, em processo de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. No setor de alimentação animal, é utilizada em ração para aves e suínos. Na área energética, empregada visando à fabricação de produtos como o etanol (RODRIGUES, 2008).

O mercado de celulasas ganhou impulso no início do século XXI quando houve grandes investimentos na produção de celulasas, especialmente focada para sua

aplicação na obtenção de biocombustível. Novozymes e Genencor, liberaram um montante de US\$ 17,1 milhões com a meta de reduzir em 10 vezes o custo efetivo das celulases. Esta meta foi superada já em 2004 com uma redução de 12 vezes no custo da enzima. Segundo a BIOMM Technology, o mercado brasileiro de celulases é estimado em cerca de US\$ 30 a 130 milhões até 2015 e de US\$ 290 a 380 milhões para 2020 (CASTRO, 2010).

Haja vista a abundância de biomassa celulósica da Amazônia, faz-se necessário a realização de pesquisas referentes à purificação, caracterização e quantificação enzimática visando à otimização das condições de cultivo de bactérias produtoras de celulases que se encontram depositadas na coleção bacteriológica do Laboratório de Microbiologia da UFAM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas e aplicação biotecnológica

Conforme Oliveira (2010), enzimas são biocatalizadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária e termolábeis, que aceleram a velocidade de uma reação química, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações e efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos, sejam plantas ou animais, desde os mais simples aos mais desenvolvidos.

Avanços técnicos e científicos que ocorreram, principalmente, a partir do século XX favoreceram a utilização das enzimas, sendo que estas passaram a ocupar papéis importantes em produtos e processos industriais, permitindo que fossem empregadas em larga escala. A versatilidade das enzimas possibilita seu uso em diversas aplicações, incluindo processos de catálise de polímeros naturais, tais como amido, celulose e proteínas, bem como para síntese seletiva de produtos químicos assimétricos. No futuro, novas aplicações biotecnológicas devem impulsionar o mercado de enzimas industriais.

A substituição de catalizadores químicos, em processos industriais, pelas enzimas possibilita redução de tempo e energia, de rejeitos industriais que podem comprometer o meio ambiente revertendo assim, em benefícios econômicos (MAESTER, 2011).

Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidorreductase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorreductase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase), de papel (lipase, oxidorreductase, xilanase), e de couro (lipase, protease) (OLIVEIRA et al., 2006) e a maior dificuldade ao uso das mesmas nesses processos está relacionado ao alto custo desse catalisador. A preferência pelo uso industrial de enzimas decorre de sua natureza protéica, seu uso em baixas concentrações e sua inocuidade, já que estas enzimas são inativadas durante o processamento (SALAMONI, 2005).

A perspectiva de desenvolvimento da biotecnologia no século XXI, em diferentes setores industriais, é muito promissora, visto que diversas indústrias têm demonstrado um forte potencial de desenvolvimento, tendo se destacado a indústria de alimentos e fármacos, seguida da indústria de produção de enzimas microbianas (ALBUQUERQUE, 2009). Atualmente, quase todas as enzimas preparadas em escala industrial são extracelulares porque seu isolamento dos meios de cultivo é geralmente mais simples, embora elas se encontrem sob forma muito diluída nestes meios (KIELING, 2002).

Segundo Politzer e Bon (2006), a Tecnologia Enzimática está ultrapassada no Brasil, embora se possua uma enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis que podem ser transformadas em produtos úteis e de maior valor agregado.

Os autores enfatizam a importância da tecnologia enzimática para a indústria de fármacos e alimentos, já que o Brasil é um grande produtor dos mesmos.

2.2 Mercado mundial de enzimas

De acordo com Maester (2011), o comércio global da produção de enzimas foi estimado em 2,3 bilhões de dólares em 2003, cujo principal montante foi dividido em detergentes (US\$ 789 milhões), aplicações alimentícias (US\$ 634 milhões), agricultura (US\$ 237 milhões) e outras, incluindo enzimas para produção de tecidos e produtos químicos (US\$ 222 milhões). O setor comercial de celulases é dominado internacionalmente pelas empresas Genencor e Novozymes, esta última com uma fábrica em Curitiba. No contexto nacional, a comercialização de preparados celulásicos movimentou até setembro de 2010, 23 toneladas em exportação e 67 toneladas em importação de preparados celulásicos, provenientes da União Europeia e norte americana (ZÚÑIGA, 2010).

2.3. Celulose

Estruturalmente, a celulose é um homopolímero formado por muitas cadeias de glicose unidas entre si por ligações β -1,4 como mostrado na FIGURA 1. O grau de polimerização das fibras celulolíticas é bastante variável e pode possuir de 7.000 a 14.000 monômeros de glicose na parede celular primária e até 500 monômeros na parede secundária. As cadeias de celulose ligam-se entre si através de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando assim as fibras de celulose (NUNES, 2010).

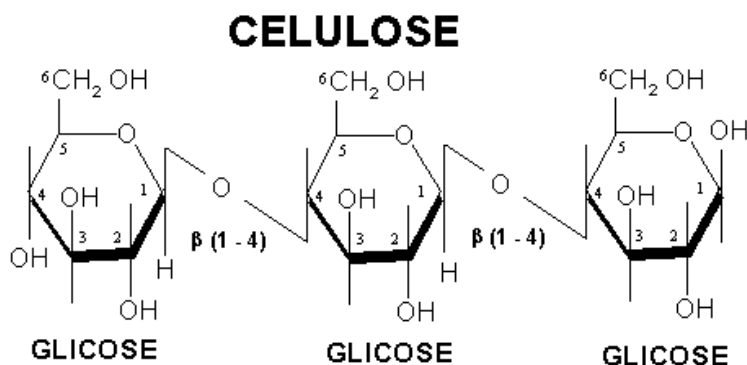


FIGURA 1: Estrutura da celulose
FONTE: www.portalsaofrancisco.com.br

A disposição das microfibrilas de celulose possui cristalização variável, encontrando-se desde a maneira cristalina pura até bastante irregular, chamada de amorfa (NUNES, 2010) conforme a FIGURA 2.

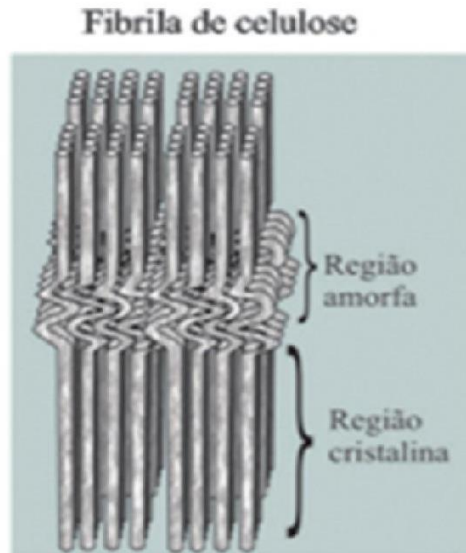


FIGURA 2: Microfibrila de celulose (GONÇALVES, 2011).

Segundo Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003), a celulose é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada a glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem.

Em sua forma natural, a celulose não ocorre com 100% de pureza. Este polímero encontra-se associado com outros polissacarídeos como amido, pectina, lignina e hemicelulose (BISARIA; GHOSE, 1981) conforme a FIGURA 3. É o principal material estrutural das plantas e o componente principal do algodão, madeira, linho, palha e folhas de milho. Possui um alto peso molecular, sendo constituída por mais de 10.000 moléculas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4(GABRIEL, 2009).

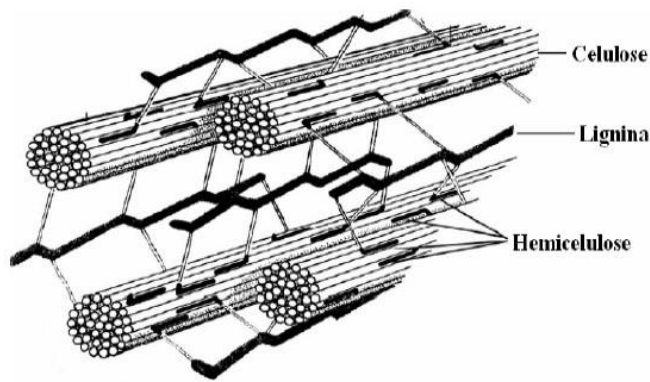


FIGURA 3: Arranjo típico da parede celular vegetal.
 FONTE: SILVA, 2010.

Durante a síntese de celulose as moléculas de glicose são unidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, o que resulta em uma forma rígida, insolúvel e resistente à hidrólise enzimática conforme a FIGURA 4. Estas cadeias são orientadas em paralelo com uma extremidade redutora e outra não redutora com regiões altamente ordenadas e cristalinas intercaladas por regiões paracristalinas ou amorfas (SALAMONI, 2005).

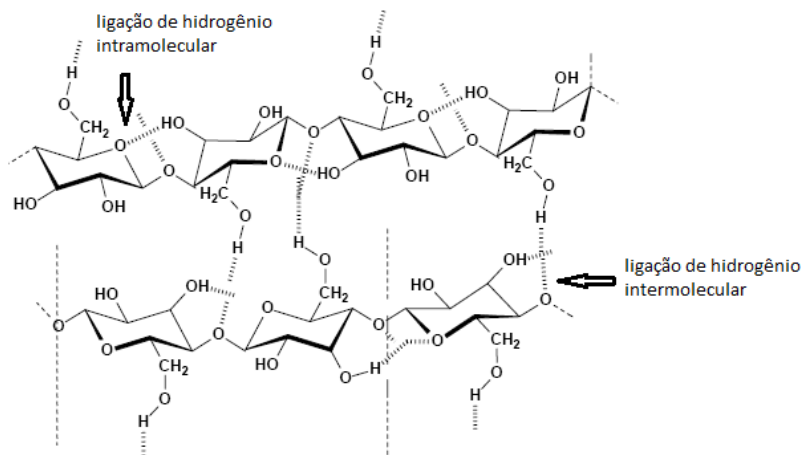


FIGURA 4: Estrutura química da celulose (Morais, 2005).

O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua procedência e processamento. A celulose de algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de cristalinidade de 40% (SILVA et al., 2009).

A celulose pode ser convertida em seus monômeros constituintes de cinco e seis carbonos através da hidrólise (adição de água à molécula) com o auxílio de um catalisador. Quando a hidrólise é realizada com ácidos concentrados a conversão atinge resultados satisfatórios, porém, o custo de recuperação dos ácidos é muito alto e todos estes processos operam em batelada (SOARES; ROSSELL, 2007).

2.4 Hidrólise da celulose

A transformação dos polímeros da celulose em glicose é uma etapa fundamental na produção de alimentos, energia, produtos químicos e farmacêuticos. A sacarificação da celulose pode ser levada a efeito por hidrólise ácida ou enzimática (BASSO et al, 2010).

A hidrólise da celulose catalisada por ácido é uma reação complexa e heterogênea, envolvendo fatores físicos e químicos seguindo o mecanismo de clivagem das ligações glicosídicas β - 1,4. Durante a hidrólise ácida, a xilose é rapidamente degradada a furfural e outros co-produtos de condensação, os quais são inibitórios a microrganismos. A hidrólise ácida, além de formar compostos inibidores para subsequente fermentação, também apresenta outros problemas, tais como, condições de manuseio severas (pH e temperatura), e o alto custo de manutenção devido os problemas de corrosão (SILVA, 2010).

O processo de hidrólise enzimática é conduzido em condições brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45° e 50° C), o custo utilidade é relativamente baixo, além de permitir maiores rendimentos e apresentar baixo custo de manutenção (não há problema de corrosão). A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea catalisada pelas celulasas, sendo distinguida por um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzimas). A completa hidrólise da celulose requer a ação combinada de múltiplas enzimas (celulasas) com diferentes especificidades ao substrato (SILVA, 2010).

2.5 Celulases

O processo de hidrólise enzimática envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção. No entanto, a vantagem da hidrólise enzimática da celulose em relação à hidrólise ácida é que a reação pode ser conduzida em condições relativamente moderadas (BASSO, 2010).

A celulose pode ser clivada por intermédio de enzimas, denominadas celulases, que reconhecem as ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose (FERREIRA, 2010), liberando como produto diversas cadeias curtas de celulose, oligossacarídeos, e ainda celobiose e glucose livre. Por esse motivo estas enzimas são produzidas por vários microrganismos, sendo que isto sugere a necessidade da capacidade de degradação de celulose, possivelmente adquirida por um antepassado primordial no início do desenvolvimento evolutivo, devido à pressão seletiva (TIBONI, 2011).

As enzimas do complexo celulolítico estão divididas em três classes (OGEDA; PETRI, 2010) e sua atuação pode ser vista na FIGURA 5.

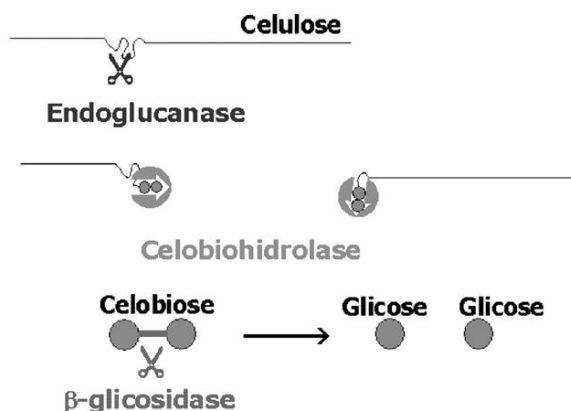


FIGURA 5: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose

As endoglucanases agem de forma aleatória, clivando ligações β -1,4-glucosídicas, dentro da molécula de celulose. Seu modo de ação diminui a viscosidade específica da CMC significativamente devido as clivagens intramoleculares, resultando em uma rápida diminuição do comprimento da cadeia. As celobiohidrolases

(exoglucanases) clivam os segmentos nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias expostas pela endoglucanases, gerando celobiose. Estas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. As β - glicosidases, enzima que hidrolisa celobiose (solúvel) a unidade de glicose. A remoção da celobiose é um passo importante no processo da hidrólise enzimática, uma vez que ela auxilia na redução do efeito inibitório de celobiose sobre a EG e CBH (BORTOLAZZO, 2011).

As celulases compreendem 15 famílias das 99 famílias de glicosil hidrolases. Esta nomenclatura é aplicada para uma variedade de domínios catalíticos da enzima. Dentro de uma mesma família, as enzimas relacionadas não necessariamente refletem uma relação filogenética entre os organismos que as produzem (SALAMONI, 2005).

Estudos têm sido realizados na busca das celulases capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies produtoras dessas enzimas mediante aplicação de métodos de engenharia genética (BUSSAMRA, 2010).

2.6. Microrganismos celulolíticos

Os microrganismos são fontes de enzimas utilizadas na indústria. Entretanto, mesmo com o surgimento de novas tecnologias moleculares, menos de 1% dos microrganismos foram cultivados em laboratório e o potencial de 99% permanece inexplorado (MOLINARI, 2008).

O uso de microrganismos e enzimas microbianas pelo homem no processamento de materiais naturais tem uma longa tradição. Esta capacidade de exploração de biossintéticos microbianos ocorreu naturalmente e foi facilitada pela ubiquidade dos

microrganismos. A preferência pela química orgânica sintética baseada em enzimas de microrganismos e não pela clássica catalise química é devida à especificidade que as enzimas possuem, e, além disso, os produtos do metabolismo secundário microbiano são compatíveis tanto em relação à eficiência quanto com a sua interferência ambiental (MAESTER, 2011).

A identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (OLIVEIRA, 2010).

O mecanismo de hidrolise das celulases produzidas por bactérias é pouco estudado. Toda bactéria celulolítica secreta endoglucanase com propriedades diferentes, a maioria mostra uma pequena atividade na estrutura cristalina da celulose. Algumas exoglucanases de origem bacteriana já foram caracterizadas, mas apenas duas foram identificadas como exoglucanases e apenas uma atuou sinergicamente com a endoglucanase na hidrolise da estrutura cristalina da celulose (RODRIGUES, 2008).

2.7 Fermentação submersa

Desde a época do pós-guerra, a indústria de fermentação passou por um período de grande expansão, devido ao rápido desenvolvimento de métodos para a produção de antibióticos em cultivo submerso.

Os processos fermentativos de produção de enzimas podem ser conduzidos tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto em meio sólido, chamado de fermentação em estado sólido (FES) (SANTOS,2011). O ambiente fornecido nesses dois métodos é bem diferente em relação ao teor líquido, e isso caracteriza a produção de diferentes tipos de enzimas (PACHECO, 2011). Segundo

Aguilar (2008), a fermentação em estado sólido possui desvantagens, como somente o uso de microrganismos capazes de crescerem sob níveis reduzidos de umidade, a dificuldade em determinar parâmetros (pH, umidade, taxa de oxigênio livre e dióxido de carbono) e sua baixa utilização em largas escalas .

As enzimas de interesse industrial têm sido produzidas por culturas líquidas submersas. As fermentações submersas apresentam grande homogeneidade e eficiente transferência de nutrientes, já que consistem de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis (ALONSO, 2001). Proporciona, também, facilidade no controle dos parâmetros físico-químicos do processo (pH, temperatura e agitação), além da facilidade de recuperação das enzimas. (PINHEIRO, 2006).

2.8 Método do Ácido Dinitrossalicílico

Um dos métodos de determinação de glicose em amostras líquidas mais utilizado no é o do ácido Dinitrossalicílico (DNS), do final da década de 1950 (MILLER, 1959). Esse método do tem como princípio o fato dos açúcares reduzirem o reagente DNS na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrossalicílico, um produto de cor laranja avermelhado, que pode ser facilmente mensurado em 540 nm, como pode ser visto na Figura 6. O grupo aldeído dos açúcares redutores é oxidado para carbonila (TIBONI, 2011).

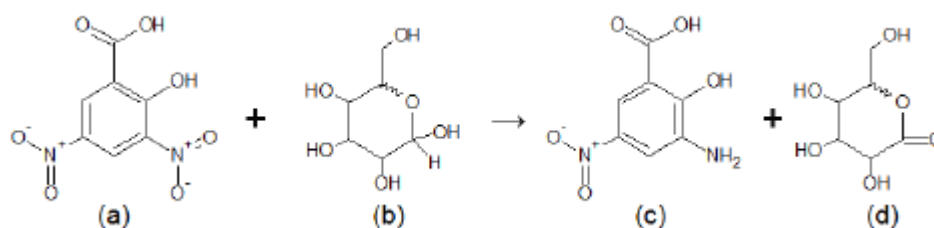


FIGURA 6: Esquema de reação de redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico formando composto colorido.

NOTA: (a) ácido 3,5-dinitrossalicílico (cor amarela); (b) açúcar redutor genérico; (c) 3-amino-5-nitrossalicílico (cor laranja-avermelhada) e (d) açúcar oxidado.

2.9 Tendências futuras para produção de celulases

A produção de celulases e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando seu aumento de produtividade e economicidade (CASTRO, 2010).

O conceito de engenharia de produto pode ser aplicado em processos de produção de celulases, visando a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, em particular EnG (endoglucanases) e BG (beta-glucosidase). O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases, pela produção em separado das celulases e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas, ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (CASTRO, 2010).

2.10 Aplicação de celulases na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, as celulases atuam na obtenção de sopas, cereais e vegetais desidratados, e são adicionadas de forma a aumentar a rehidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores. Na fabricação de pães, biscoitos e bolos, as celulases são adicionadas para melhorar a textura, pela hidrólise de gomas e para permitir uma melhor distribuição dos aromas. A adição de celulases ao processo de panificação leva a um aumento no volume do pão e melhora a porosidade no pão de trigo integral (SANTOS, 2011).

Juntamente com as pectinases, as celulases e hemicelulases (xilanases, mananases e arabinases), são denominadas enzimas de maceração, sendo utilizadas para a extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. Celulases são adicionadas ao

suco de frutas para promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos (SANTOS, 2011).

2.11 Purificação de enzimas

As enzimas comerciais apresentam-se desde preparações enzimáticas brutas até enzimas altamente purificadas (BON et al., 2008). A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza, portanto a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima. Um problema significativo da purificação é decorrente da complexidade estrutural destas enzimas e a necessidade de manter as suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (BASSANI et al., 2010).

De forma geral, as enzimas podem ser purificadas por etapa única (por exemplo, cromatografia de afinidade) ou por uma combinação de várias etapas (por exemplo, precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, etc.). A precipitação é descrita como uma tecnologia bastante simples, que pode ser utilizada para remover impurezas ou isolar uma proteína alvo numa mistura (KANWAR et al., 2006).

2.12 Sistema de duas fases aquosas

De forma geral, a formação dos SAB (Sistem Aquoso Bifásico) ocorre quando dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietilenoglicol, dextrano, dentre outros) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) são misturados acima de certa concentração crítica resultando em duas fases imiscíveis, onde o maior constituinte é água (GARZAMADRID et al., 2010) conforme a FIGURA 7. Esse sistema é formado por PEG e dextrana ou PEG e sais, este último têm sido empregados para a extração de enzimas em

larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade e elevada seletividade (MALPIEDI et al., 2009).

O polietilenoglicol (PEG), HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons, sendo obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que 40.000 g/mol com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino (CARVALHO, 2004).

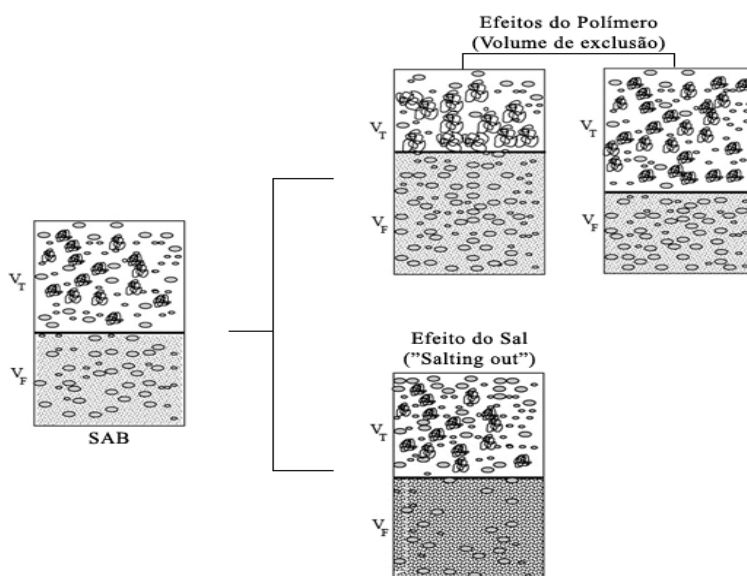


FIGURA 7: Representação esquemática da partição dos biocompostos no SAB: (●) polímero; (●) Enzimas/proteínas; (●) Sal; V_T: volume da fase de topo; V_F: volume da fase de fundo (BABU *et al.*, 2008).

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismo

Neste estudo foram analisadas 20 isolados de bactérias previamente identificadas, isoladas de diferentes substratos e preservadas segundo Cruz Filho (2006) e depositadas na coleção bacteriológica do Laboratório de Microbiologia. As amostras de *Bacillus* estavam preservadas em tubo de ensaio em ágar nutritivo inclinado, a 4°C.

3.2 Reativação das amostras

Os isolados de *Bacillus* foram reativados em triplicata, por semeadura em superfície, em placa de Petri com ágar nutritivo, incubados a 37°C, por 24 horas (Bier 1985; Holt et al., 1994). Em seguida foram preservados em microtubos contendo glicerol 20% (v/v) a -20°C, e em tubos de ensaios com ágar nutritivo a 4°C (Muro; Luchi, 1989).

3.3 Seleção de bactérias produtoras de celulases

Para verificar a atividade enzimática dos microrganismos, os isolados foram repicados para Ágar Celulose [KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹; extrato de levedura, 1 g/L]; substrato indutor (carboximetilcelulose, 0,5%) como única fonte de carbono, 2% de Ágar bacteriológico e água destilada 1000 mL, pH ajustado para 7,0} em Erlenmeyer 50 mL (SOUZA et al., 2008). O crescimento foi observado durante 24h.

3.4 Identificação bacteriana

Na identificação bacteriana, utilizou-se a metodologia de Cowan and Steel's, segundo o Manual de Identificação de Bactérias de Interesse Médico. Este método é internacionalmente reconhecido e padronizado para a identificação de bactérias, permitindo diagnosticar todas as bactérias com probabilidade de serem encontradas em laboratórios de saúde pública, na prática médica e veterinária (BARROW; FELTHAM, 1999).

A morfologia das bactérias foi estudada através do Método de Coloração de Gram e de endósporos. As amostras identificadas foram armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas.

3.5 Fermentação submersa

Dos isolados que apresentaram crescimento foi retirada uma alíquota para obtenção de uma suspensão celular semelhante à coluna 1,0 da escala de Mac Farland. Desta suspensão retirou-se uma alíquota (2×10^6 células/mL) para 50 mL de Ágar Celulose e mantidos sob agitação 150 rpm durante 24h para estimular a secreção enzimática. Posteriormente, o fermentado foi centrifugado a 15000 rpm e filtrado em membrana (0,22 mm) para obtenção do extrato enzimático bruto (SENA, 2006).

3.6 Análise qualitativa da produção de celulase

Para o teste da atividade enzimática do extrato bruto, foram preparados meios com Agar bacteriológico (1,8%), carboximetilcelulose (1%) e água destilada (100 mL). Após esterilização, foram distribuídos em placas de Petri 120x20 mm onde foram feitas perfurações circulares de 5 mm de diâmetro (técnica de “cup plate”) no meio das placas onde foram adicionados 100µL do extrato bruto. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente adicionadas de revelador Vermelho Congo (0,1%) seguido de uma lavagem com solução de NaCl 1 M para visualização e determinação do diâmetro dos halos de degradação do substrato (SENA, 2006).

3.7 Seleção da bactéria por análise quantitativa da produção de celulase

A quantificação da produção de celulase via açúcares redutores foi realizada utilizando o método de Miller (1959) com a construção de uma curva de calibração tendo como base a solução-estoque de 2,5g/dL de glicose segundo Biazus (2007).

Foram preparados em tubos contendo 0,5 mL do extrato bruto, 1,5 mL de água deionizada e 3 mL de DNS. Após aquecidas e resfriadas, as amostras foram analisadas a 540 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220). O tubo branco para calibração do equipamento foi constituído dos reagentes supracitados sem o extrato bruto. Posteriormente foi montado um gráfico da concentração *versus* absorvância para quantificar a melhor produção de açúcares redutores (BIAZUS et al, 2007).

3.8 Efeito de diferentes temperaturas e pH na atividade celulolítica em planejamento fatorial

Foram estimados os efeitos de diferentes temperaturas e pH em planejamento experimental completo (2^3) com 4 repetições no ponto central (Tabela 1) utilizando Solução Manachini e repetidos os itens 5.6 a 5.7 (CAVALCANTI et al., 2008).

Tabela 1: Planejamento experimental completo (2^3) com 4 repetições no ponto central tendo com fatores pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

| Ensaio | pH | Temperatura |
|--------|----|-------------|
| 1 | 5 | 37 |
| 2 | 9 | 37 |
| 3 | 5 | 60 |
| 4 | 9 | 60 |
| 5 | 7 | 45 |
| 6 | 7 | 45 |
| 7 | 7 | 45 |
| 8 | 7 | 45 |

3.9 Seleção da melhor fonte de carbono e nitrogênio

Foram preparados em frascos Erlenmeier 10mL de Solução Manachini contendo 0,5% de carboximetilcelulose acrescido de 1% de diferentes fontes de carbono (tapioca, crueira e araruta) e nitrogênio (peptona, extrato de malte e extrato de levedura).

Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo-se empregado como substrato a carboximetilcelulose sódica a 2%, em tampão citrato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH, 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C , durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, também pela reação com ácido dinitrosalicílico conforme item 5.7. Utilizaram-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, dos valores de absorbância obtidos.

3.10 Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na atividade celulolítica em planejamento fatorial

Após seleção das melhores fontes de carbono e nitrogênio, foi realizado novo planejamento experimental completo (2^3) com 4 repetições no ponto central (Tabela 2) utilizando Solução Manachini e repetidos os itens 5.7 (CAVALCANTI et al., 2008).

Tabela 2: Planejamento experimental completo (2^3) com 4 repetições no ponto central tendo com fatores fonte de carbono e nitrogênio.

| Ensaio | Tapioca | Peptona |
|--------|---------|---------|
| 1 | 0,5 | 1,5 |
| 2 | 1,5 | 1,5 |
| 3 | 1,0 | 1,0 |
| 4 | 1,0 | 1,0 |
| 5 | 1,0 | 1,0 |
| 6 | 1,0 | 1,0 |
| 7 | 0,5 | 0,5 |
| 8 | 1,5 | 0,5 |

3.11 Preparação do Sistema de Duas fases aquosas

Os experimentos para extração da celulase foram realizados com solução de Polietileno Glicol (50% p/v) de diferentes massas molares, PEG 400, 4000 e 6000 e soluções de fosfato (40%), consistindo de uma mistura de quantidades adequadas de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 , em pH 7,0; 8,0 e 9,0. O sistema foi preparado em tubo de centrífuga graduado contendo uma mistura de quantidade necessária de polímero e sal, no qual foi adicionado o extrato enzimático com a celulase que representou 20% (m/m), do total da massa do sistema, no qual foi adicionado água para completar peso final de 3g. Todos os sistemas foram agitados em vortex por 60 segundos e as duas fases separadas por 60 minutos. Em seguida, os volumes da fase superior e inferior foram medidas, separando-se com pipetas, individualmente, cada uma dessas fases para determinação da atividade celulolítica e teor de proteína.

3.12 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína, Atividade, Rendimento, Seletividade e Fator de Purificação

Para determinação do coeficiente de partição protease (A), seletividade (B) rendimento teórico % (C) e o fator de purificação (grau de pureza) (D) utilizaram-se as fórmulas descritas abaixo (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005):

$$(A) K_{ae} = \frac{A_{\text{topo}} \text{ (Atividade proteica na fase leve)}}{A_{\text{fundo}} \text{ (Atividade proteica na fase pesada)}} \quad (B) S = \frac{K_{\text{biomolécula alvo}}}{K_{\text{proteínas totais}}}$$
$$(C) R_{(S)}\% = \frac{100}{[1+V_I (V_S \times K)]} \quad (D) PF = \frac{A_t/C_t}{A_i/C_i}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 bactérias reativadas da coleção do laboratório, 6 apresentaram crescimento em ágar celulose (Tabela 3). Dentre os *Bacillus* que apresentaram crescimento em ágar celulose, *Bacillus liqueniformis* B54 foi a bactéria que apresentou maior atividade celulolítica após fermentação submersa de acordo com análise estatística (Tabela 4) e confirmada a identificação segundo a tabela 6.9c do Manual de Identificação.

TABELA 3: Identificação das bactérias que apresentaram crescimento em ágar celulose segundo Cowan and Steel's .

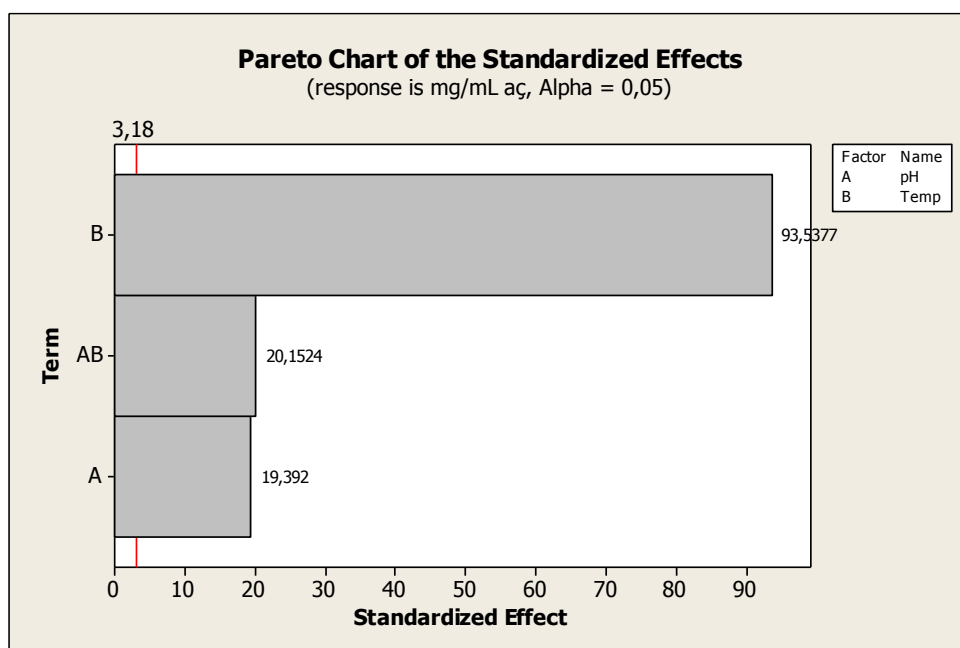
| Cód | Identificação | CMC |
|-----|-------------------------------|-----|
| B10 | <i>Bacillus circulans</i> | + |
| B17 | <i>Bacillus megaterium</i> | + |
| B28 | <i>Bacillus anthracis</i> | + |
| B29 | <i>Bacillus laterosporus</i> | + |
| B32 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | + |
| B54 | <i>Bacillus liqueniformis</i> | + |

TABELA 4: Informações de agrupamento usando o teste de Tukey, onde o não compartilhamento de letras indica diferenças significativas.

| Amostra | N | Média | Média |
|---------|---|-------|-------|
| B54 | 3 | 0,15 | A |
| B10 | 3 | 0,09 | B |
| B17 | 3 | 0,02 | C |
| B32 | 3 | 0,01 | D |
| B29 | 3 | 0,01 | D E |
| B28 | 3 | 0,01 | E |

Nota: Todas as comparações foram pareadas entre níveis de amostras

Segundo Palladino (2010), *Bacillus liqueniformis* é uma bactéria de interesse do gênero, pelo caráter não patogênico. É encontrada amplamente distribuída na natureza, sendo uma bactéria do solo. Esta espécie vem sendo utilizada na produção industrial de alfa-amilase e várias proteases sendo classificada como GRAS (Generally Reconized As Safe) por U.S. Food and Drug Administration (ÇALIK, 1998).



O Diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a atividade de celulasas, estabelecendo quais destes efeitos encontraram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise estatística. De acordo com o gráfico obtido, observa-se que o pH apresentou maior influência sobre a atividade enzimática e que a variação de temperatura, no intervalo estudado,

praticamente não apresentou influência na atividade enzimática, entretanto, a região ótima de atividade celulolítica foi obtida pela combinação de temperatura a 37° e pH 5,0.

Estes resultados comprovam com Singh *et al.* (2012) em seu trabalho de otimização da produção e purificação de celulase bacteriana por bioprocesso em estado sólido de biomassa da agroindústria *Bacillus licheniformis* verificou a maior produção enzimática mais estável sob condições mais ácidas. Assim como Bischcoff et al. (2006) num estudo de purificação e caracterização de uma enzima do complexo celulolítico moderadamente termofílica de *Bacillus liqueniformis* observou um perfil de atividade ampla de pH, com máxima em pH 6,0.

Vale ressaltar também que a grande maioria das celulasas reportadas na literatura científica são obtidas em condições de pH ácido (OLIVEIRA et al., 2009). Em um estudo realizado por Aguiar et al. (2008), a máxima produção de celulasas a partir de resíduos lignocelulósicos utilizando o fungo *Aspergillus niger*, foi obtida em pH 5,0 e temperatura de 50°C. Também Wulff (2002) em seu estudo de caracterização enzimática de celulasas produzidas por *Xylella fastidiosa* verificou a maior atividade celulolítica em pH ácido (entre 5,2 e 5,6) e temperatura de 65°C.

Conforme análise estatística a tapioca apresentou-se como melhor fonte de carbono. A atividade de celulase variou significativamente em resposta à fonte de carbono utilizada no meio de cultura para o crescimento do microrganismo. A produção da celulase foi significativamente maior durante o crescimento do microrganismo em tapioca (Tabela 5).

TABELA 5: Informações de agrupamento usando o teste de Tukey, onde o não compartilhamento de letras indica diferenças significativas

| Amostra | N | Média | mg/mL | |
|---------|---|-------|-------|---|
| Tapioca | 3 | 0,041 | 0,1 | A |
| Araruta | 3 | 0,020 | 0,05 | B |
| Crueira | 3 | 0,013 | 0,03 | C |
| CMC | 3 | 0,010 | 0,02 | C |

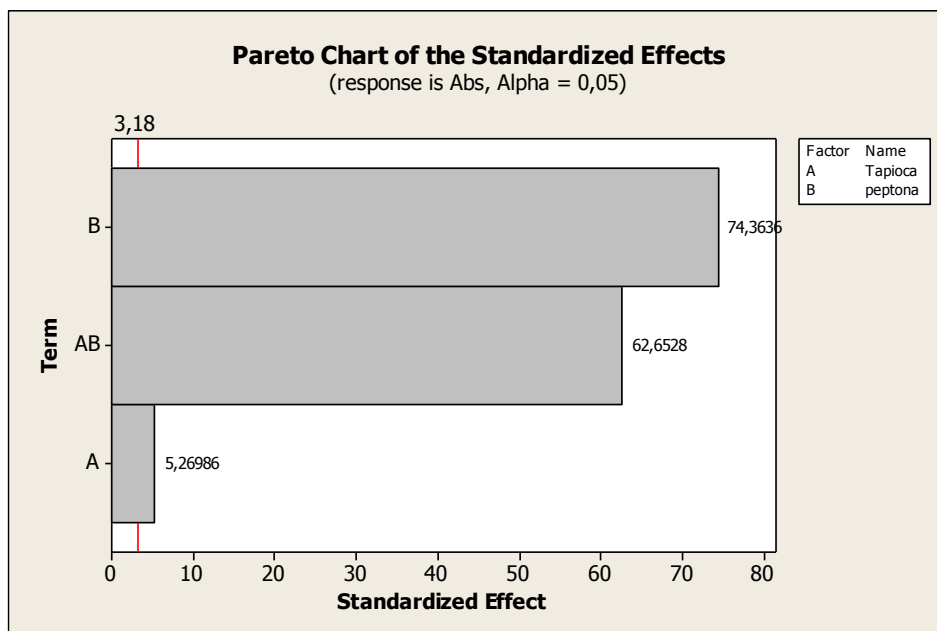
Nota: Todas as comparações foram pareadas entre níveis de amostras

Segundo análise estatística a peptona se apresentou como sendo a melhor fonte de nitrogênio para a síntese. A suplementação do meio de cultivo com peptona de caseína proporcionou um aumento da produção de celulase. A atividade máxima da enzima (0,16 mg/mL) (Tabela 6).

TABELA 6: Informações de agrupamento usando o teste de Tukey, onde o não compartilhamento de letras indica diferenças significativas

| Amostra | N | Média | mg/mL | |
|------------|---|-------|-------|---|
| Peptona | 3 | 0,064 | 0,16 | A |
| Extr. Lev. | 3 | 0,047 | 0,11 | B |
| Malte | 3 | 0,025 | 0,06 | C |
| CMC | 3 | 0,010 | 0,02 | D |

Nota: Todas as comparações foram pareadas entre níveis de amostras



De acordo com o gráfico obtido, observa-se que a variação da concentração de tapioca apresentou maior influência sobre a atividade enzimática e que a variação da concentração de peptona de caseína, no intervalo estudado, praticamente não apresentou

influência na atividade enzimática, entretanto, a região ótima de atividade celulolítica foi obtida pela combinação da concentração de 1,5% de tapioca e 0,5% de peptona. A atividade máxima de celulase obtida foi de 0,95 mg/mL.

A Tabela 7 mostra os volumes das fases de topo e fundo em cada amostra. Observa-se que as fases começaram a serem formadas a partir da amostra 5. A Tabela 8 mostra os valores do coeficiente de partição protease, seletividade, rendimento teórico % e o fator de purificação (grau de pureza).

TABELA 7: volumes de topo e fundo e relação entre as duas fases

| Amostra | vol. Total | vol. topo | vol. Fundo | VR |
|----------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------|
| 1 | | NF | NF | NF |
| 2 | | NF | NF | NF |
| 3 | | NF | NF | NF |
| 4 | | NF | NF | NF |
| 5 | 12,375 | 3,94 | 8,44 | 0,467 |
| 6 | 12,375 | 5,06 | 7,31 | 0,692 |
| 7 | 12,375 | 2,25 | 10,13 | 0,222 |
| 8 | 12,375 | 3,38 | 9,00 | 0,375 |
| 9 | 12,375 | 3,94 | 8,44 | 0,467 |
| 10 | 12,375 | 3,94 | 8,44 | 0,467 |
| 11 | 12,375 | 3,38 | 9,00 | 0,375 |
| 12 | 12,375 | 3,94 | 8,44 | 0,467 |

TABELA 8: coeficiente de partição protease, seletividade, rendimento teórico % e o fator de purificação

| Amostras | Topo | Fundo | K | R topo % | FP | S | K pt |
|----------|--------|-------|-------|----------|------|-------|-------|
| 1 | | | NF | | | | |
| 2 | | | NF | | | | |
| 3 | | | NF | | | | |
| 4 | | | NF | | | | |
| 5 | 1,391 | 0,136 | 10,24 | 82,69 | 1,76 | 12,17 | 0,841 |
| 6 | 0,067 | 0,032 | 2,07 | 58,92 | 0,08 | 2,16 | 0,959 |
| 7 | 1,345 | 0,764 | 1,76 | 28,13 | 1,70 | 1,42 | 1,238 |
| 8 | 0,775 | 2,589 | 0,30 | 10,09 | 0,98 | 0,41 | 0,730 |
| 9 | 0,061 | 0,245 | 0,25 | 10,40 | 0,08 | 0,24 | 1,044 |
| 10 | 0,061 | 0,245 | 0,25 | 10,40 | 0,08 | 0,22 | 1,109 |
| 11 | 0,015 | 0,458 | 0,03 | 1,21 | 0,02 | 0,03 | 1,296 |
| 12 | -0,002 | 0,470 | 0,00 | -0,23 | 0,00 | 0,00 | 1,440 |

5. CONCLUSÃO

A metodologia do sistema de duas fases aquosas mostrou-se eficiente para a purificação de celulasas visto que a atividade celulolítica do topo e fundo apresentou diferença significativa e as maiores atividades foram obtidas pela fase do topo que corresponde ao PEG (polietilenoglicol).

6 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. S. Detecção de enzimas hidrolíticas em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco. 71 f. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

ALMEIDA, M. N. Celulasas e Hemicelulasas de Espécies de *Acremonium* Endofíticos. (Pós-Graduação) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais- Brasil. 2009.

ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ). Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio De Janeiro, 2001.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 83-89, 2008.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 331p., 1999.

BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1- polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 75, p. 532-537, 2010.

BIAZUS, J. P. M. et al.. Desenvolvimento de *kits* para análise de níveis em pacientes com suspeita de diabetes *mellitus*. Exacta, São Paulo, v.5, n. 1, p 155-161, jan/jun. 2007.

BISSARIA, V. S.; GHOSE, T. K.. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 3, p. 90 – 104, 1981.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado, Rio de Janeiro, 2008.

BRADFORD, M. M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry v.72, p.248.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba,2011.

BUSSAMRA, B. C. Produção de celulase em cultivo de alta densidade celular utilizando *Escherichia coli*. 19º Programa Bolsa de Verão – 2010. São Paulo, Campinas, fev., 2010.

ÇALICK, P. ; ÇALICK, G.; OZDAMAR, T.H. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by bacillus liqueniformis: Use of citric acid as the carbon source. Enzyme and Microbiol Technology, v.23, p. 451-461, 1998.

CARVALHO, C. Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Dissertação, Departamento de tecnologia de alimentos, UFV, Viçosa, 2004.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.– RJ, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

CAVALCANTI, M.T.H. et al. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG–phosphate system. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1771–1776, 2008.

CHANG, C.; CHANG-CHAI N.G.; WANG, C.; SHYU, Y. Activity of cellulase from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from Brassica waste compost. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Piracicaba, v. 66, n. 3, June 2009 .

CRUZ FILHO, R. F. (2006) Avaliação do potencial biotecnológico de pigmentos produzidos por bactérias do gênero *Serratia* isoladas de substratos amazônicos. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

FERREIRA, V. Recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

GABRIEL, J. R. Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivado do óleo de mamona. Dissertação (doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos. 2009.

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1082-87, 2010.

KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R. K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression and Purification*, v. 46, p. 421-428, 2006.

KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Florianópolis – SC. p. 5 – 7. Jul/2002.

LIMA, U. A. et al. *Biotechnology Industrial*. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo-SP vol. 2, p. 205-218. 2001.

MAESTER, T. C. Prospecção de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas degradadoras de hidrocarboneto de petróleo. Dissertação, USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2011.

MILLER, G. L. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.” *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

MOLINARI, H. B. C. Metagenômica: uma nova ferramenta biotecnológica. *Revista Opiniões*, p. 54-57, jul-set/2008.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. (2005). Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. Revista Árvore, v. 29, n. 3, p. 461-470.

NUNES, M. F. Atividades das enzimas celulase e xilanase durante a decomposição anaeróbia de macrófitas aquáticas. Dissertação (Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais) Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, J. F. Enzimas Hidrolíticas Extracelulares de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment, 2006.

OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca do coco verde (*cocos nucifera L.*) para produção de celulases. Tese (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

OSAKI, F. Distribuição Espacial de Microrganismos e Fertilidade em Solos de dois Ecossistemas Florestais: Floresta Ombrófila Mista e Povoamento Florestal com *Pinus Taeda L.* Tese (Pós-Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, 2008.

PACHECO, M. S. Leite cru refrigerado do agreste pernambucano: caracterização da qualidade e do sistema de produção. Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2011.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. ISBN – 85-204-2032-X. 1ª Edição. 2005.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. Dissertação (Programa de mestrado em engenharia de alimentos da URI-Campus de Erechim), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 2006.

POLITZER K.; BON, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Rio de Janeiro-RJ. 2006.

RODRIGUES, G. R. Prospecção de Genes de Celulase Presentes dm Biblioteca Metagenômica. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. JABOTICABAL, 2008.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Revista Brasil. Bot., v.27, n.2, p.205-211, 2004,

SALAMONI, S. P. Produção e caracterização de celulases secretadas por streptomyces sp. Isolados de processos de compostagem. Dissertação (mestrado). Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre/ RS, mai/2005.

SANTOS, A. F. Novas perspectivas da glicerina-Síntese de novos nitratos com propriedades farmacológicas e melhoradores de cetano. Disponível em

<http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=879> Acesso em janeiro, 2011.

SENA, A. R.; KOBLITS, M. G. B.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T.. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, Feira de Santana, n.35, p.91-98, 2006.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas naquímica de polímeros e em compósitos. Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 661-671, 2009.

SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. (Graduação)- Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Núcleo de Análise Interdisciplinar de Políticas e Estratégias. Vol. 3, Nova Série, p. 8 - 9, 2007.

TIBONI, M. Monitoramento da atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com azul brilhante de remazol. (Dissertação) Ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

ZÚÑIGA, R. U. F. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, 2010.

8. CRONOGRAMA

| Nº | Descrição | Ago 2011 | Set | Out | Nov | Dez | Jan 2012 | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul |
|----|--|-------------|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | Revisão da Literatura | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 2 | Reativação bacteriana | | R | R | | | | | | | | | |
| 3 | Reidentificação bacteriana | | | | R | R | | | | | | | |
| 4 | Teste qualitativo da produção de enzima | | | | | | R | R | | | | | |
| 5 | Teste quantitativo da produção de enzima | | | | | | | | R | | | | |
| 6 | Determinações de proteínas totais | | | | | | | | | R | | | |
| 7 | Efeito das diferentes temperaturas na atividade celulolítica | | | | | | | | | | R | | |
| 8 | Efeito de diferentes pH na atividade celulolítica | | | | | | | | | | R | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|--|--|--|----------|----------|----------|--|--|--|----------|----------|----------|
| 9 | Condições de cultivo para produção de celulase em planejamento fatorial | | | | | | | | | | | R | |
| 10 | Preparação da apresentação parcial oral | | | | R | | | | | | | | |
| 11 | Relatório Parcial | | | | | R | R | | | | | | |
| 13 | Elaboração do Resumo e Relatório Final | | | | | | | | | | R | R | R |
| 14 | Preparação da Apresentação Final para o Congresso | | | | | | | | | | | R | R |