

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos
Geisa Mayana Miranda de Souza
Ana Carolina Sousa Costa
(Organizadoras)

As Ciências Biológicas nas Dimensões Humanista, Crítica e Reflexiva

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Rafael Sandrini Filho
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
C569	As ciências biológicas nas dimensões humanista, crítica e reflexiva [recurso eletrônico] / Organizadoras Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos, Geisa Mayana Miranda de Souza, Ana Carolina Sousa Costa. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-601-0 DOI 10.22533/at.ed.010190309 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Silva-Matos, Raissa Rachel Salustriano da. II. Souza, Geisa Mayana Miranda de. III. Costa, Ana Carolina Sousa. CDD 574
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

AVALIAÇÃO DE GLICOSIDASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS OBTIDAS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE LARVAS DE *Hypsipyla* spp. (Lepidoptera: Pyralidae)

John Lucas Ribeiro

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém/Pará

Yuri Rafael de Oliveira Silva

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém/Pará

Ana Luiza Freire

Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte/MG

Carlos Augusto Rosa

Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte/MG

Agenor Valadares Santos

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém/Pará

Luciana Pereira Xavier

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém/Pará

como a microbiota de insetos, é importante para se obter tanto micro-organismos como enzimas com potencial de aplicação biotecnológica. As glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em oligossacarídeos e glicoconjugados, e utilizadas na produção de biocombustíveis e na indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de α - e β -glicosidases extracelulares produzidas por leveduras endossimbiontes obtidas do intestino de larvas da Broca-da-Andiroba (*Hypsipyla* spp.). Os isolados foram selecionados para a produção de glicosidases extracelulares em meio sólido na presença de Esculina 0,1%. O efeito do pH (4,0-9,0) e temperatura (25°C-70°C) na atividade de glicosidase, foi analisado usando *p*-nitrofenil-glicopiranosídeo como substrato. Todas as leveduras apresentaram atividade enzimática extracelular: β -glicosidase - pH ótimo alcalino e temperatura ótima ~40°C, com destaque para a cepa *Candida jaroonii* (M2); α -glicosidase – pH ótimo variando de ácido à alcalino e temperatura >40°C, destacando as cepas *Candida tropicalis* (M4) e *Candida jaroonii* (M2) com atividade a 70°C, 76 mU.ml⁻¹ e 91 mU.ml⁻¹, respectivamente. Atividades mais altas em pH alcalino permitem uma mais ampla aplicação desta classe de enzimas. O presente trabalho é pioneiro no estudo de glicosidases de leveduras da microbiota de *Hypsipyla* spp.

RESUMO: A bioprospecção de micro-organismos de ambientes não explorados,

PALAVRAS-CHAVE: enzimas, levedura, larvas, broca do broto

EVALUATION OF EXTRACELLULAR GLUCOSIDASES PRODUCED BY YEASTS FROM THE GUT MICROBIOTA OF *Hypsipyla* spp. LARVAE (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

ABSTRACT: Bioprospection of microorganisms at unexplored sites, such as insect microbiota, is important for obtaining both microorganisms and enzymes, with potential biotechnological applications. Glucosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds of oligosaccharides and glycoconjugates, used in the production of biofuels and the food industry. The objective of this work was the evaluation of extracellular α - and β -glucosidases produced by endosymbiont yeasts from the gut of Broca-da-Andiroba larvae (*Hypsipyla* spp.). The isolates were screened for the production of extracellular glucosidase on solid medium in the presence Esculin 0.1%. The effect of pH (4.0-9.0) and temperature (25°C-70°C) on glucosidase activity were analyzed using p-nitrophenyl-glucopyranoside as substrate. All yeasts had extracellular enzymatic activity: β -glucosidases showed an alkaline pH optimum and temperature \sim 40°C, highlighting the strain *Candida jaroonii* (M2). α -glucosidases presented a pH optimum ranging from acid to alkaline and temperature $>$ 40°C, highlighting the strains *Candida tropicalis* (M4) and *Candida jaroonii* (M2) with activity at 70°C, 76 mU.ml⁻¹ and 91 mU.ml⁻¹, respectively. Higher activities in alkaline pH can provide a broader application of this class of enzymes. The present work is pioneer in the study of yeast glucosidases of *Hypsipyla* spp. microbiota.

KEYWORDS: enzymes, yeast, larvae, shoot borer

1 | INTRODUÇÃO

A *Carapa guianensis* Aublet e *C. procera* DeCandolle (Meliaceae), conhecidas popularmente como Andiroba, são espécies arbóreas de uso variado como anti-inflamatório, cicatrizante, velas repelentes, entre outros (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; PINTO, 2007). O óleo extraído de suas sementes possui alto valor comercial sendo alvo de interesse em diferentes segmentos industriais como os de fármacos e cosméticos (GOMES, 2010).

Os principais insetos que predam as semente de andirobeiras são larvas das espécies *Hypsipyla ferrealis* Hampson e *H. grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) (JESUS-BARROS et al., 2015 e 2014; PINTO et al., 2013). A ação destes insetos nas sementes na Andiroba reduz o potencial de germinação, alterando a capacidade de regeneração das espécies, e conseqüentemente na redução da quantidade e qualidade do óleo extraído (CRAWLEY; GILLMAN, 1989; PINTO, 2007).

No Brasil, a *H. grandella* preda, além da andirobeira, o meristema apical de outras espécies da família Meliaceae, como o cedro (*Cedrela odorata* L.) e o mogno (*Swietenia macrophylla* King), podendo atacar as sementes ou se desenvolver no

interior do tecido prejudicando o crescimento das plantas jovens (JESUS-BARROS et al., 2015). A *H. ferrealis* é conhecida como broca-das-sementes e sua presença já foi relatada nos estados do Pará (BECKER, 1971), Amapá (JORDÃO; SILVA, 2006), Roraima (JORDÃO; SILVA, 2006; QUERINO et al., 2008), Amazonas (PINTO, 2007) e Acre (SANTOS; PELLICCIOTTI, 2016).

A capacidade dos insetos predarem diferentes partes de uma planta bem como diferentes plantas contribuiu de certa forma para o sucesso evolutivo da classe. De acordo com a estimativa global feita por Stork (2018), a classe insecta possui cerca de 5,5 milhões de espécies vivas. Este fenômeno tem sido explicado pela habilidade dos insetos em utilizarem uma gama extensa de materiais orgânicos na sua nutrição (madeira, húmus, cera, sangue, seiva, tecidos animais e vegetais, etc). Além de digerirem materiais refratários (ex. madeira e cera), eles exploram recursos tóxicos não acessíveis a outros animais, como os inibidores enzimáticos. Esta capacidade digestiva depende das enzimas presentes e compartimentalizadas no intestino do inseto (TERRA et al., 1996). A organização do processo digestivo depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo do intestino médio que são responsáveis pela translocação das enzimas e dos produtos da digestão (TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA et al. 1996, HOLTOF et al., 2019).

As enzimas encontradas nos insetos são sintetizadas pelos próprios insetos (homólogas) ou por organismos simbióticos localizados no corpo dos insetos (heterólogas). O uso destas enzimas para aplicações nos campos da biotecnologia industrial ganha cada vez mais interesse. Exemplos importantes de enzimas derivadas de insetos incluem proteases, amilases, lipases, celulasas, quitinases e glicosidases (FISCHER; OSTAFE; TWYMAN, 2013; MIKA; ZORN; RÜHL, 2013; MERZENDORFER, 2013).

Celulasas são enzimas envolvidas na hidrólise de moléculas de celulose em monossacarídeos ou polissacarídeos menores. Três classes de enzimas compõem as celulasas: (a) endo- β -1,4-glicanases (E.C. 3.2.1.4), responsáveis por clivar ligações β -1,4-glicosídicas internas das cadeias de celulose, gerando cadeias de glicanos de diferentes tamanhos; (b) exo- β -1,4-glicanases (E.C. 3.2.1.91), que agem na ponta das cadeias de celulose, liberando β -celobiose; e (c) β -1,4-glicosidases (E.C. 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose gerando glicose.

As glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas de oligossacarídeos e polissacarídeos, liberando α -glicose ou β -glicose. As α -glicosidases são muito utilizadas na indústria alimentícia, principalmente na fabricação de cerveja e xarope de glicose (TAYLOR; DEWAR, 1994; BADHAN et al., 2007; AKINLOYE et al., 2012), assim como na produção de etanol, realizando a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis (MUSLIN et al., 2002). As β -glicosidases são investigadas principalmente com a finalidade de degradação da celulose para a produção de biocombustíveis, mas também tem papel importante nas indústrias de alimentos e bebidas, de papel, de cosméticos e farmacêutica (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016).

Estima-se que aproximadamente 20% de todos os insetos estão obrigatoriamente associados a micro-organismos simbióticos, e é provável que esta associação tenha contribuído grandemente para seu sucesso evolutivo (FELDAAR; GROSS, 2008). Leveduras simbiotes de insetos estão relacionadas ao auxílio direto no processo de digestão e na detoxificação de material ingerido de plantas, podendo prover suplemento nutricional ao hospedeiro. Os insetos envolvidos nesta associação incluem membros das ordens Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, entre outros (VEGA; DOWD, 2005; ROSENBLUETH et al., 2018).

Apesar do enorme potencial da microbiota intestinal dos insetos, pouco é estudado sobre o potencial biotecnológico das enzimas produzidas pelos micro-organismos simbióticos. Os lepidópteros não são exceção, os estudos sobre as microbiotas das espécies pertencentes a esta ordem de insetos normalmente limitam-se ao interesse entomológico da questão, e exploram majoritariamente as bactérias do intestino médio (SITTENFELD et al., 2002; BRODERICK et al., 2004; ERTURK; DEMIRBAG, 2006; BRINKMANN; MARTENS; TEBBE, 2008; BRODERICK et al., 2009; CHEN et al., 2016; SNYMAN et al., 2016).

O potencial de aplicação biotecnológica das enzimas obtidas a partir de micro-organismos já é conhecido, visto que aproximadamente 85% das enzimas industriais é de fonte bacteriana ou fúngica (GARG et al., 2016). A busca por enzimas na microbiota de insetos tem recebido algum destaque apenas nos últimos anos, contudo tem sido pouco explorada devido à dificuldade no cultivo de muitos dos micro-organismos presentes (CHAVES; NETO; TENREIRO, 2009; SHI et al., 2010; BERASATEGUI et al., 2016).

Parte dos estudos neste sentido foram voltados para os termitas, na prospecção de lignocelulases produzidas tanto pelos insetos quanto por seus endossimbiontes (SCHARF, 2015). Sabe-se também que existem endossimbiontes capazes de degradar celulose, em diferentes ordens de insetos, inclusive nos lepidópteros *Bombyx mori*, *Samia cynthia pryeri* e *Diatraea saccharalis* (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012; DANTUR et al., 2015).

A maioria das indústrias como a de couro, alimentos, têxteis, síntese orgânica, farmacêutica e indústria de detergentes dependem em parte do processo enzimático, o que acarreta uma maior demanda por produção de enzimas (KANNAN et al., 2019). MIKA, ZORN e RÜHL (2013), em trabalho de revisão, pontuam que tanto as enzimas obtidas dos insetos ou dos micro-organismos associados possuem alta demanda na indústria de alimentos, por reduzirem fatores antinutricionais.

Até o momento não há relatos na literatura quanto aos micro-organismos que compõem a microbiota de larvas de *Hypsipyla* spp. ou sobre quais as reações hidrolíticas que ocorrem em seu trato intestinal. Portanto o objetivo deste trabalho foi a detecção e a caracterização de α - e β -glicosidases extracelulares produzidas por leveduras isoladas do intestino de larvas da Broca-da-Andiroba (*Hypsipyla* spp.) (Lepidoptera: Pyralidae).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação das leveduras

As leveduras utilizadas neste trabalho pertencem à coleção do Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações (LaBEB), ICB-UFPA (registro no SISGEN sob nº A5B286D). Os micro-organismos foram obtidos do intestino de larvas em condições assépticas. As leveduras foram isoladas por diluição seriada e posterior inoculação em meio Sabouraud. A identificação foi feita com base comparativa na região ITS e a região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA de cada uma das amostras. As regiões foram sequenciadas utilizando-se o DYEnamic™ (Amersham, Biosciences) no sistema de sequenciamento automático MegaBACETM 1000. A análise das sequências foi realizada utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0, disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), comparando as sequências obtidas com as depositadas no GenBank.

2.2 Detecção da atividade glicosidásica

A atividade enzimática foi detectada através de ensaios de degradação de substrato em ágar, adicionando Esculina (0,1%) e Citrato Férrico de Amônio (0,05%) ao meio de cultura YPD (Extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 1%). Os micro-organismos foram inoculados em ponto central e incubados a 30°C por 24h, a presença de glicosidases foi detectada pela formação de halo marrom escuro a preto.

2.3 Obtenção do extrato enzimático

O extrato enzimático foi produzido pelo cultivo *overnight* dos micro-organismos em meio líquido YM (Glicose 1%, Peptona 0,5%, Extrato de Levedura 0,3%, Extrato de Malte 0,3%), sob agitação (100 rpm/min) e temperatura 30°C, seguido de centrifugação a 3000 x *g* por 15 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi considerado como extrato enzimático extracelular.

2.4 Determinação de atividade de α - and β -glicosidase

A quantificação da atividade enzimática foi realizada por método colorimétrico em espectrofotômetro (ZELCK; TRIPPENSEE; BECKER, 1996). O método consiste em quantificar o *p*-nitrofenol, que apresenta absorvância em 405nm, produzido pela hidrólise de *p*-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo ou *p*-nitrofenol- α -D-glicopiranosídeo pelo extrato enzimático. O ensaio foi realizado em diferentes valores de pH (4,0 a 9,0) e de temperatura (25°C a 70°C) para determinar pH ótimo e temperatura ótima de cada atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Uma unidade enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de

pNGP por minuto nas condições de ensaio.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das seis leveduras previamente isoladas, todas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* (Tabela 1). A isolada LU2 foi identificada como *Candida tropicalis*. Leveduras desta espécie já tiveram atividade de α -glicosidase descrita, por exemplo três tipos de alfa-glicosidases já foram isoladas a partir da cepa *japonica* desta espécie (SAWAI, 1956).

As outras cinco isoladas da microbiota larval da Broca-da-Andiroba foram identificadas como *Candida jaroonii*. Esta espécie é pouco descrita na literatura e há apenas relato de isolamento desta espécie em diferentes regiões da Tailândia, cujo clima se assemelha ao da Amazônia, as espécies isoladas foram provenientes de flores, filófera de arroz, fungos e excrementos de insetos usados como fertilizantes (IMANISHI et al., 2008; LIMTONG; KAEWWICHIAN, 2015). Recentemente, *C. jaroonii* foi isolada de madeira em decomposição do Brasil, dos ecossistemas de Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica (LOPES et al., 2018).

Isolados (cód.)	Espécie	nº de acesso (GenBank)	Identidade	Gaps	Região rRNA
M1	<i>Candida jaroonii</i>	KY106531	413/413(100%)	0/413(0%)	D1/D2
M2	<i>Candida jaroonii</i>	KY106531	465/465(100%)	0/465(0%)	D1/D2
M3	<i>Candida jaroonii</i>	KY106531	431/431(100%)	0/431(0%)	D1/D2
M4	<i>Candida jaroonii</i>	KY106531	471/471(100%)	0/471(0%)	D1/D2
M5	<i>Candida jaroonii</i>	KY106531	469/469(100%)	0/469(0%)	D1/D2
LU2	<i>Candida tropicalis</i>	KY106851	493/493(100%)	0/493(0%)	D1/D2

Tabela 1: Identificação das leveduras isoladas da microbiota intestinal da Broca-da-Andiroba.

A atividade enzimática extracelular se apresentou positiva para todas as leveduras avaliadas, avaliadas em placa com meio ágar-esculina, com enfoque à isolada *C. jaroonii* (M2) que obteve o maior valor da razão halo/colônia, de 3,35 mm (Tabela 2).

Espécie	Razão halo/colônia (mm)
<i>Candida jaroonii</i> (M1)	1,39
<i>Candida jaroonii</i> (M2)	3,35
<i>Candida jaroonii</i> (M3)	1,42
<i>Candida jaroonii</i> (M4)	2,05
<i>Candida jaroonii</i> (M5)	2,34
<i>Candida tropicalis</i> (LU2)	1,39



Tabela 2. Detecção de atividade de glicosidases em placa ágar-esculina. Em negrito destaca-

se a maior razão halo colônia. Em inserto resultado da atividade de glicosidase em placa dos isolados *C. jaroonii* (M1), *C. jaroonii* (M2) e *C. jaroonii* (M3).

Os micro-organismos avaliados foram submetidos à ensaios de atividade enzimática com substrato sintético para se analisar a especificidade e caracterizar a atividade glicosidásica de cada extrato enzimático. O ensaio de atividade de β -glicosidase foi realizado no extrato enzimático das cinco cepas de *C. jaroonii*, as quais apresentaram curva de atividade semelhantes, ocorrendo as melhores atividades em pH ácido (Tabela 3), assim como para a curva de atividade da isolada LU2, *C. tropicalis*. Tais resultados são condizentes com os descritos na literatura para atividades de β -glicosidases produzidas por leveduras (PERISIN; JARAK, 1995; SAHA; BOTHAST, 1996; NARASIMHA et al., 2016).

Leveduras	β -glicosidase		α -glicosidase	
	pH	Temperatura	pH	Temperatura
<i>C. jaroonii</i> (M1)	4,0; 7,5	35-50°C	4,5; 6,0; 8,0	40°C
<i>C. jaroonii</i> (M2)	4,0	50°C	6,0; 8,0	40°C
<i>C. jaroonii</i> (M3)	4,5	35°C	8,0	50-60°C
<i>C. jaroonii</i> (M4)	4,0; 5,0	40°C	5,0	70°C
<i>C. jaroonii</i> (M5)	5,0	40-60°C	4,5	40°C
<i>C. tropicalis</i> (LU2)	5,5	35°C	8,5	70°C

Tabela 3. Determinação dos valores máximos de pH e temperatura para atividades de α - e β -glicosidases extracelulares das leveduras isoladas.

O isolado que mostrou maior atividade mediante às condições testadas foi *C. jaroonii* (M1) (Figura 1). Pode-se observar um pequeno pico de atividade glicosidásica em pH 7,5, indicando a possível presença de mais de um tipo de β -glicosidase no extrato. A presença de atividade intracelular de β -glicosidase de *C. jaroonii*, isolada de ecossistema brasileiro, mostrou eficiência em fermentar celobiose (LOPES et al., 2018).

O pH intestinal varia dependendo da região analisada em muitos insetos (TERRA; FERREIRA, 1994) e este fato tem relação direta na produção e atividade enzimática por micro-organismos endossimbiontes. Na literatura encontram-se descritos pH ótimos de 4,5 à 6,0 (PRATVIEL-SOSA et al., 1994; FERREIRA et al., 1994; BÖER et al., 2004), entretanto nos ensaios de para determinação do efeito do pH na atividade de α -glicosidase foi observado atividade máxima das leveduras tanto em pH ácido como em pH alcalino (4,5 a 8,5) (Tabela 3). α -amilases alcalinas, da classe das glicosidases, têm seu uso já instituído na indústria de detergente. Esta aplicação se dá pela estabilidade destas enzimas à condições oxidativas, devido

à sua atividade em pH básico e em baixas temperaturas (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). Além disso, aplicação na indústria alimentícia, da produção de xaropes à panificação, é bem descrita na literatura (SAINI et al., 2017).

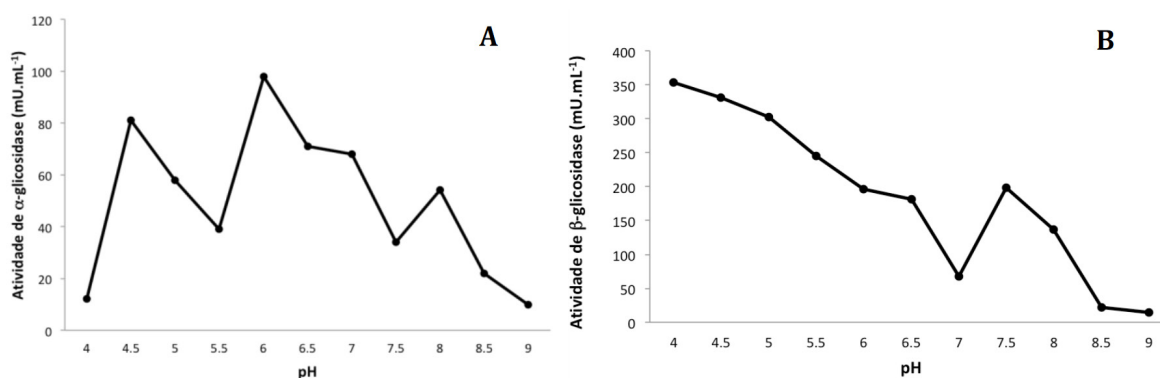


Figura 1. Avaliação do efeito da variação de pH nas atividades de α -glicosidase (A) e de β -glicosidase (B) extracelulares contidas no extrato de *C. jaroonii* (M1).

Quanto ao efeito de temperatura na atividade das β -glicosidases produzidas pelos isolados verificou-se que as temperaturas máximas variaram de 35°C à 60°C (Tabela 3), esta faixa de temperatura é bem descrita para β -glicosidases extracelulares (PERISIN; JARAK, 1995; KARNCHANATAT et al., 2007). Comportamento parecido ao encontrado para α -glicosidases, cuja variação foi de 40°C à 70°C (Figura 2).

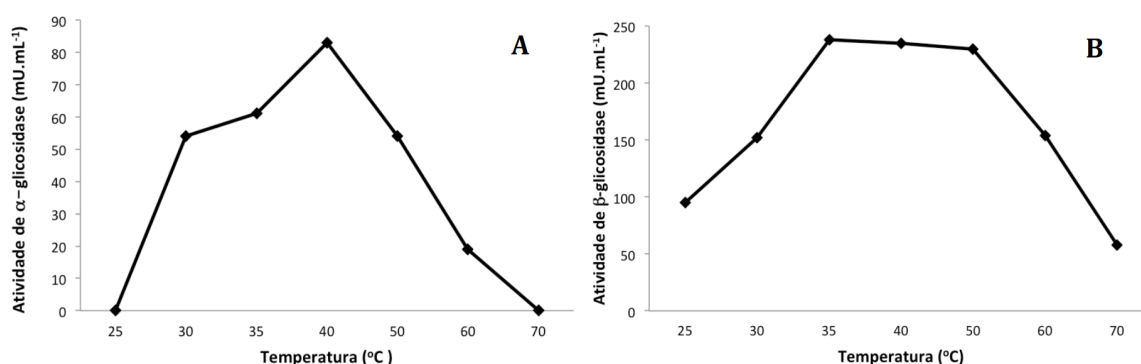


Figura 2. Avaliação do efeito da variação de temperatura nas atividades de α -glicosidase (A) e de β -glicosidase (B) extracelulares contidas no extrato de *C. jaroonii* (M1).

Karnchanatata e colaboradores (2007) em estudos com β -glicosidases extracelulares de *Daldinia eschscholzii* observaram que estas enzimas possuem termoestabilidade a 45°C, sendo que a 60°C a atividade decai e, a 70°C aproxima-se de zero. Tal comportamento frente a variação de temperatura também pode ser notado em nossos resultados (Figura 2) para todas as leveduras estudadas excetuando *C. jaroonii* (M4) e *C. tropicalis* (LU2).

4 | CONCLUSÃO

As enzimas, α -glicosidase e β -glicosidases, avaliadas neste trabalho apresentaram características com potencial para aplicação industrial, como atividade máxima em temperaturas elevadas e em pH alcalino, além de atividade em ampla faixa de temperatura. Portanto, avaliação de glicosidases produzidas por leveduras da microbiota de insetos, como a broca-da-Andiroba se mostrou uma abordagem eficiente para prospecção de enzimas e reafirma o potencial da biodiversidade amazônica tanto para enriquecimento teórico como para a obtenção de produtos com valor agregado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq e UFPA.

REFERÊNCIAS

- AKINLOYE, O. A. et al. Partial purification and some properties of α -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Biokemistri**. v. 24, n. 1, p. 31-37, 2012.
- BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**. v. 98, n. 3, p. 504-510, fev. 2007.
- BECKER, V. O. Microlepidópteros que vivem nas essências florestais no Brasil. **Revista Floresta**. Curitiba, v. 3, n. 1, p. 85-90, jan./abr., 1971.
- BERASATEGUI, A. et al. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 100, n. 4, p.1567-1577, 2016.
- BÖER, E. et al. Characterization of the AINV gene and the encoded invertase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 86, p. 121-134, 2004.
- BRINKMANN, N.; MARTENS, R.; TEBBE, C. C. Origin and Diversity of Metabolically Active Gut Bacteria from Laboratory-Bred Larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). **Appl. Environ. Microbiol**. v. 74, n. 23, p. 7189-7196, 10 out. 2008.
- BRODERICK, N. A. et al. Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 70, n. 1, p.293-300, 1 jan, 2004.
- BRODERICK, N.A. et al. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis* - induced mortality vary across a range of Lepidoptera. **BMC Biology**. v. 7, n. 1, p.1-9, 2009.
- CALDERÓN-CORTÉS, N. et al. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 43, n. 1, p.45-71, dez. 2012.
- CHAVES, S.; NETO, M.; TENREIRO, R. Insect-symbiont systems: From complex relationships to biotechnological applications. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p.1753-1765, dez. 2009.

- CHEN, B. et al. Biodiversity and activity of the gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-14, 8 jul. 2016.
- CRAWLEY, M.J.; GILLMAN, M.P. Population-dynamics of cinnabar moth and ragwort in Grassland. **Journal of Animal Ecology**, v. 58, p. 1035-1050, 1989.
- DANTUR, K. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **Amb Express**, v. 5, n. 1, p.1-11, 25 fev. 2015.
- ERTURK, Ö.; DEMIRBAG, Z. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). **African Journal Of Biotechnology**. v. 5, n. 22, p. 2081-2085, nov. 2006.
- FELDHAAR, H.; GROSS, R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 299, p. 1-8, 2009.
- FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazônica**. v. 32, n. 4, p. 647-661, 2002.
- FERREIRA, C. et al. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 107A, p. 631-640, 1994.
- FISCHER, R.; OSTAFE, R. TWYMAN, R. Cellulases from insects. In: VILCINSKAS, A. (ed). **Yellow Biotechnology II**. Springer, Berlin Heidelberg, p. 51-64, 2013.
- GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**. v. 6, n. 1, p.47, 8 fev. 2016.
- GOMES, H. S. R. **Estrutura populacional e produção de andiroba em terra firme e várzea no sul do Amapá**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, Macapá.
- HOLTOF, M. et al. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9>.
- IMANISHI, Y. et al. Two new ascomycetous anamorphic yeast species related to *Candida friedrichii*-*Candida jaronii* sp. nov., and *Candida songkhlaensis* sp. nov.-isolated in Thailand. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 267-76, Ago. 2008.
- JESUS-BARROS, C. R. et al. Registro da ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* e *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) em frutos de andirobeiras (*Carapa guianensis*, Meliaceae) em Macapá – AP, Brasil. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 765-769, jul.-set., 2015.
- JORDÃO, A. L.; SILVA, R. A. **Guia de pragas agrícolas para manejo integrado no estado do Amapá**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. 130 p.
- KANNAN, M. et al. Insect gut as a bioresource for potential enzymes - an unexploited area for industrial biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 18. março 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.048>.
- KARNCHANATAT, A et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS Microbiol Lett**. v. 270, n. 1, p. 162-70, maio 2007.

- LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R. The diversity of culturable yeasts in the phylloplane of rice in Thailand. **Ann. Microbiol.** v. 65, p. 667–675, 2015.
- LOPES, M. R.; LARA, C. A.; MOURA, M. E. F.; UETANABARO, A. P. T.; MORAIS, P. B.; VITAL, M. J. S.; ROSA, C. A. Characterisation of the diversity and physiology of cellobiose-fermenting yeasts isolated from rotting wood in Brazilian ecosystems. **Fungal Biology.** v. 122, p. 668-676, 2018.
- MERZENDORFER, H. Insect-Derived Chitinases. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** v. 136, p 19-50, 2013.
- MIKA, N.; ZORN, H.; RÜHL, M. Insect-Derived Enzymes: A Treasure for Industrial Biotechnology and Food Biotechnology. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** DOI: 10.1007/10_2013_204.
- MUSLIN, E. H. et al. The effect of proline insertions on the thermostability of a barley alpha-glucosidase. **Protein Eng.** v. 15, n. 1, p. 29-33, 2002.
- NARASIMHA, G. et al. Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. **Int. J. of Food Prop.** v. 19, n. 3, p. 652-661, 2016.
- PERICIN, D.; JARAK, M. Production and some characteristics of beta-glucosidase in *Diaporthe (Phomopsis) helianthi*. **Acta Microbiol Immunol Hung.**, 42(1): 29-37. 1995.
- PINTO, A. A. **Avaliação de danos causados por insetos em sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e andirobinha (*C. procera*) (Meliaceae) na Reserva Florestal Ducke em Manaus, AM. Brasil.** 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.
- PINTO, A. A. et al. Predação de sementes de andiroba [*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC. (Meliaceae)] por insetos na Amazônia. **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, p.1115-1123, dez. 2013.
- PRATVIEL-SOSA, F. et al. Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumatococcus pinnatifidus* larvae. Part 1. Purification and some properties of an α -glucosidase. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 84B, p. 77-81, 1986.
- QUERINO, R. B. et al. **Predação de sementes de andiroba (*Carapa* spp.) por *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae) em Roraima.** Boa Vista: Embrapa, 2008. (EMBRAPA: Boletim de Pesquisa e Desenvol., n. 5).
- ROSENBLUETH, M. et al. Endosymbiotic microorganisms of scale insects. **TIP Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas.** v. 21, n. 1, p. 53-69, 2018.
- SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, Purification, and Characterization of a Highly Glucose Tolerant Novel β -Glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 62, n. 9, p. 3165-3170, 1996.
- SAINI, R. et al. Amylases: Characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.** v 6, n. 4, p 1865-1871, 2017.
- SANTOS, R. S.; PELLICCIOTTI, A. S. Ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) em andiroba no estado do Acre. **Ciência Florestal.** Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 995-998, jul.-set., 2016.
- SAWAI, T. Alpha-Glucosidases of *Candida tropicalis* var. japonica. **Shokubutsugaku Zasshi**, v. 69, n. 814, p. 177-185, 1956.
- SCHARF, M. E. Omic research in termites: an overview and a roadmap. **Frontiers In Genetics**, v. 6, n.

76, 13 mar. 2015.

SHI, W. et al. Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age. **Insect Science**. v. 17, n. 3, p.199-219, 7 fev. 2010.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**. v. 6, n. 1, dez. 2015.

SITTENFELD, A. et al. Does a polyphagous caterpillar have the same gut microbiota when feeding on different species of food plants? **Revista de Biología Tropical**. v. 50, n. 2, p. 547-560, jun. 2002.

SNYMAN, M. et al. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 32, n. 7, p. 1-115, jun. 2016.

SOGAWA, K. et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI–TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**. v. 400, n. 7, p. 1905-1911, 2011.

STORK, N.E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? **Annu. Rev. Entomol.** v. 63, p. 31-45, 2018.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application Of Microbial α -Amylase In Industry – A Review. **Braz. J. of Microbiol.** v. 41, n. 4, p. 850-861, dez. 2010.

TAYLOR, J. R. N.; DEWAR, J. Role of alpha-glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mashes. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 100, p. 417-419, 1994.

TERRA, W. R. et al. Digestive Enzymes. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Ed.). **Biology of the Insect Midgut**. Londres. Chapman & Hall. p. 153-194, 1996.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 109B, n. 1, p. 1-62.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Eds.). **Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press. p. 211-243, 2005.

ZELCK, U. E.; TRIPPENSEE, G.; BECKER, W. Detection and partial characterization of glycosidases in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (gastropoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**. (Part B: Biochemistry and Molecular Biology). v. 114, n. 3, p. 281-286, 1996.