

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

IARA CIANCAGLINI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA XILANASE PRESENTE NO
(META)TRANSCRIPTOMA DO CUPIM DA ESPÉCIE *Heterotermes tenuis* E SUA
IMPORTANTE APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

São Carlos

2020

IARA CIANCAGLINI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA XILANASE PRESENTE NO
(META)TRANSCRIPTOMA DO CUPIM DA ESPÉCIE *Heterotermes tenuis* E SUA
IMPORTANTE APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em
Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos.

São Carlos

2020

Dedico este trabalho, primeiramente, à Deus que tanto me capacitou, aos meus pais que me deram todo o apoio, ao meu namorado que sempre esteve presente e muito me incentivou, aos meus amigos e ao meu Orientador que compartilhou muitos aprendizados e confiou em mim desde o primeiro dia.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, à Deus por toda a sabedoria e capacitação que me foram dadas durante todo este período. Além disso, a realização deste trabalho contou com a participação e contribuição - direta e indireta - de diversas pessoas, às quais não posso deixar de mencionar e agradecer:

Aos meus pais, Paolo e Lúcia que têm me dado amor, carinho e muito apoio em cada passo e cada decisão que realizei na minha vida. Eles são a base de tudo e, com certeza, essa realização é toda deles também.

Ao meu namorado Thiago que esteve presente nos meus dias desde o início, incentivando, ajudando, compartilhando conhecimentos e participando de cada crescimento meu.

À minha família, em especial, meu Tio Pietro que sempre esteve disponível e muito ajudou em várias etapas no decorrer da minha graduação.

Aos meus amigos de graduação, que fiz e vou levar para o resto da vida, e os de fora dela, que tanto têm me incentivado e me inspirado ao longo dos dias.

Ao meu Orientador Anderson pela confiança em mim depositada desde o primeiro dia que nos conhecemos. Sou muito grata às oportunidades que ele me ofereceu e vem me oferecendo, além dos diversos ensinamentos que ele compartilhou comigo. Ele fez toda a diferença na minha graduação e me possibilitou conhecer áreas, as quais eu desenvolvi muito amor.

Aos meus colegas e técnicos de laboratório que tanto me ensinaram e me ajudaram neste período de, aproximadamente, 4 anos que estive no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA). Este trabalho tem uma parte deles também, que fizeram toda a diferença na minha vida profissional e na pessoa que sou hoje.

Ao Secretário de curso, Rodrigo, que me ajudou e aconselhou em diversos momentos. Estando sempre aberto e presente para me auxiliar a resolver cada detalhe.

À Coordenadora Maria Cristina que me aconselhou e auxiliou em diversos momentos ao longo destes anos. Sou muito grata por essa proximidade, pelo carinho e

amor que ela transmite. Afirmando que profissionais como ela são um incentivo para todos, uma vez que o amor pelo o que ela faz transborda e inspira quem está a sua volta.

Às Agências de Fomento CNPq e FAPESP que acreditaram nos meus projetos de Iniciação Científica.

RESUMO

As xilanases são um importante grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia glicosídica de xilana formando xilose e xilobiose. Destaca-se, principalmente, a endo-1,4- β -xilanase uma hemicelulase capaz de clivar a ligação glicosídica do tipo β -1,4 que existe nas cadeias de hemicelulose presentes no material lignocelulósico - bagaço e palha - advindo da produção de etanol de primeira geração. Sua atividade na estrutura da hemicelulose relaciona-se à sua aplicação na produção de biocombustíveis, pois se produzida e isolada, pode ser utilizada na hidrólise da biomassa na produção industrial de etanol de segunda geração (2G). Tal enzima pode ser encontrada em uma variedade de gêneros de bactérias e leveduras, além de em insetos, protozoários e algas marinhas. Sua aplicação é variada e pode ser observada em outros enfoques, tais como nas indústrias de papel, indústrias de alimentos, rações e bebidas. Os cupins são insetos eusociais, com alta capacidade de degradação da biomassa, realizando essa tarefa em horas, ao contrário de fungos que podem levar semanas. Assim, esses insetos tornam-se potenciais alvos na bioprospecção enzimática. Estudos realizados por nosso grupo analisando o transcriptoma de espécies de cupins brasileiros têm identificado diversos alvos potenciais como genes essenciais para aplicação no combate a este inseto quanto de enzimas a serem produzidas heterologicamente como a que é o escopo deste trabalho. A espécie escolhida para este estudo foi *Heterotermes tenuis*, por ser espécie-praga da cana-de-açúcar, que é a matéria-prima da produção de etanol de primeira e segunda geração, além disso, tal espécie apresenta hábitos noturnos, o que indica a produção de enzimas com características divergentes das já conhecidas. Em uma análise prévia, detectou-se sequências identificadas como possível endo-1,4- β -xilanase. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho foi amplificar a região codificadora, clonar e expressar tal enzima em sistema heterólogo, a fim de avaliar sua atividade para uma possível aplicação na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: Cupim, xilanase, *Pichia pastoris*, expressão heteróloga, etanol, biocombustíveis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da celulose.....	14
Figura 2 - Representação da hemicelulose.....	15
Figura 3 - Representação da lignina.....	15
Figura 4 - Representação da estrutura da xilana e das enzimas necessárias para sua completa degradação. Evidencia-se também os grupos substituintes R1 e R2.....	17
Figura 5 - Ciclo reprodutivo em cupins. Morfologia dos cupins em um cupinzeiro e representação do ciclo de vida.....	20
Figura 6 - Avaliação da integridade do rRNA por gel desnaturante. Amostras que apresentaram as porções 28S e 18S, foram consideradas íntegras (1 e 4) e aquelas que não apresentaram uma quantificação desejada foram separadas (2 e 3).....	31
Figura 7 - Teste de integridade de cDNAs por meio da amplificação de um fragmento do gene referência da β -actina (371 pb). Após a síntese do cDNA, as amostras foram submetidas à amplificação para serem testadas, assim, obteve-se um fragmento de tamanho esperado de 371 pb. A figura indica dois exemplos de amplificações a partir de RNA extraído de cupins operários da espécie <i>Heterotermes tenuis</i> . Destaca-se que M corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb (Cellco).	32
Figura 8 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene da xilanase (609 pb). Teste realizado com a presença do controle negativo, que não amplificou, o que auxiliou a comprovar a correta elaboração da reação e à amplificação do gene referente à enzima de interesse. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Cellco).....	33
Figura 9 - PCR de colônia para confirmar as colônias recombinantes. Fez-se a PCR de 10 colônias supostamente recombinantes (numeradas de 1 a 10). Apenas a colônia 6 não apresentou amplificação do tamanho de fragmento esperado. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).	34
Figura 10 - Reação de digestão com <i>NotI</i> e <i>XbaI</i> . As amostras 1, 2 e 3 são a construção pGEM®-T Easy + xilanase fechada. E as amostras 4, 5 e 6 são as amostras tratadas com as enzimas de restrição, evidenciando a formação de 2 fragmentos correspondentes	

ao plasmídeo (3000 pb) e ao fragmento correspondente a xilanase (609 pb). Fez-se uso do marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).	35
Figura 11 - Mapa do vetor pPICZ α A. Indicando as regiões correspondentes ao promotor AOX1, o sinal de secreção α , o gene de resistência à zeocina, as possíveis enzimas de restrição que podem ser empregadas, o peptídeo C-terminal contendo o epítipo <i>c-myc</i> e a cauda de poli-histidina.....	36
Figura 12 - PCR de colônia para confirmar as colônias recombinantes. Apenas as colônias 10 e 20 deram negativas, uma vez que não indicaram amplificação no tamanho esperado (609 pb). Fez-se uso do marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).....	37
Figura 13 - Linearização da construção pPICZ α A + xilanase. A partir do sítio de restrição <i>PmeI</i> , pode-se linearizar o plasmídeo. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 1, 2 e 3- pPICZ α A + xilanase não clivado; 4, 5 e 6- pPICZ α A + xilanase clivado (4209 pb).....	38
Figura 14 - Precipitação das amostras linearizadas. Visualização dos <i>amplicons</i> referentes à pPICZ α A + xilanase linearizado na altura correta, o que comprovou que a precipitação foi feita satisfatoriamente. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 1, 2 e 3- pPICZ α A + xilanase linearizado e purificado pela técnica de precipitação.	39
Figura 15 - Esquema representando a recombinação homóloga no genoma das células da levedura <i>Pichia pastoris</i> . As regiões promotora e terminadora de AOX1, presentes no vetor, possibilitam o pareamento na região de AOX1 no cromossomo da levedura. A presença de uma extremidade coesiva, gerada na linearização do plasmídeo, dá início ao mecanismo de recombinação homóloga na levedura, levando à substituição do gene no cromossomo pelo fragmento correspondente à xilanase.	40

LISTA DE ABREVIATURA DE SIGLAS

AOX1	Promotor de Álcool Oxidase 1
cDNA	DNA complementar
DEPC	Água tratada com Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HEPES	Tamponante de ácido sulfônico zwitteriônico
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	Meio Luria Bertani
LS	Meio Low Salt
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TAE 1X	Tampão Tris-Acetato-EDTA
YEPD	Extrato de Levedura + Peptona + Dextrose)
YEPDS	Meio YEPD adicionado de sorbitol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Produção de Etanol de Segunda Geração.....	12
1.2 Xilanase	17
1.3 <i>Heterotermes tenuis</i>	19
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 Cupins.....	24
4.2 Iniciadores para a amplificação da sequência codificadora da enzima e análises <i>in silico</i> para produção heteróloga	24
4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	24
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
4.5 Purificação dos fragmentos oriundos de PCR para clonagem e ligação do inserto ao vetor	26
4.6 Clonagem e subclonagem	26
4.6.1 Reação de ligação do inserto ao pGEM®-T Easy.....	26
4.6.2 Preparo de células eletrocompetentes <i>E. coli</i> DH5- α	26
4.6.3 Transformação em <i>E. coli</i> DH5- α (pGEM®-T <i>Easy</i> + inserto purificado)	27
4.6.4 PCR das colônias transformantes e extração de DNA plasmidial após transformação	27
4.6.5 Reação de digestão com enzimas de restrição.....	28
4.6.6 Reação de ligação do inserto ao pPICZ α A	28
4.6.7 Transformação em <i>E. coli</i> DH5- α (pPICZ α A + inserto purificado).....	28

4.6.8 PCR das colônias transformantes e Extração de DNA plasmidial após transformação	29
4.6.9 Reação de Linearização do plasmídeo (pPICZ α A + xilanase).....	29
4.6.10 Precipitação do DNA.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Análises <i>in silico</i> para produção heteróloga.....	30
5.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	31
5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	32
5.4 Clonagem e subclonagem	33
5.4.1 Clonagem no pGEM®-T <i>Easy</i>	33
5.4.2 Subclonagem no pPICZ α A.....	36
5.4.3 Reação de Linearização do plasmídeo (pPICZ α A + xilanase).....	38
5.4.4 Precipitação do DNA.....	38
6 PERSPECTIVAS.....	39
6.1 Expressão em <i>Pichia pastoris</i>	39
6.2 Testes de atividade enzimática	41
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção de Etanol de Segunda Geração

A crescente preocupação mundial em minimizar a dependência de combustíveis fósseis, em reduzir a poluição do planeta, bem como a ocorrência da pandemia, que muito influenciou na locomoção populacional e numa maior preocupação com o meio ambiente, têm incentivado a busca por soluções mais sustentáveis para as situações cotidianas. Ademais, o advento de novas tecnologias incentivou uma mudança de hábitos, a qual influenciou em um aumento dos cuidados com o meio ambiente, com a sustentabilidade e com a redução da emissão de carbono. Neste sentido, a produção de etanol de segunda geração (2G) aparece como uma fonte renovável e visa diminuir os problemas energéticos e ambientais por auxiliar com a redução da emissão dos compostos aromáticos, bem como suprir o aumento da demanda por combustíveis (AGUIAR, LUCENA, 2011; PACHECO, 2011; HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013).

O Brasil apresenta demasiadas vantagens no tocante à produção de etanol tanto de primeira quanto de segunda geração, devido à sua biodiversidade, diversidade de matéria-prima, ampla agricultura, tecnologias de produção e ao potencial econômico e mercado de biocombustíveis sem a necessidade de desmatamento ou competição com a produção de alimentos (HOWARD *et al.*, 2003; PACHECO, 2011). A cana-de-açúcar, cuja cultura é considerada limpa e renovável, aparece neste cenário como principal matéria-prima empregada no processo produtivo do etanol, o qual vem crescendo e tem perspectivas para crescer ainda mais ao longo dos anos, devido ao desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (PACHECO, 2011). Os compromissos assumidos no Protocolo de Kyoto e no Acordo de Paris, dos quais o Brasil é signatário, embasam todas essas convicções por meio de um objetivo comum de diversos países na redução da emissão de gases estufa e na redução do aquecimento global. Outro ponto importante é o RenovaBio, um programa do Governo Federal instituído em 2017, que tem como principal objetivo a expansão da produção de biocombustíveis no Brasil, além de controlar a poluição emitida pelos meios de transporte (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2017). Além disso, destaca-se a

criação da Biofuturo, uma plataforma internacional que visa ao incentivo de uma maior produção e consumo dos biocombustíveis (PIERRO, 2020).

Assim, o etanol de segunda geração surge em uma conjuntura do aumento da demanda pelo etanol, do surgimento de novas políticas aplicadas na área e da necessidade da busca por novos métodos produtivos empregando os subprodutos gerados na produção de etanol convencional sem a competição com a produção de alimentos, principalmente, em locais que não apresentam um solo apropriado para o cultivo da cana-de-açúcar (PACHECO, 2011). Destaca-se que essa geração emprega os subprodutos de origem vegetal que contém lignocelulose, tais como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, para a produção do etanol e estes materiais são baratos, abundantes e renováveis, o que fornece grande vantagem em sua utilização (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Além disso, a produção de etanol contribui para a redução da emissão de gases do efeito estufa, principalmente, o CO₂, à medida que este, que é liberado pelos automóveis, é consumido a partir da fotossíntese realizada pela cana-de-açúcar presente nas plantações ou retido na matéria orgânica do solo (RESENDE *et al.*, 2001). Segundo dados fornecidos pela RenovaCalc, uma ferramenta que realiza cálculos a fim de comprovar o desempenho ambiental da produção de biocombustíveis, em 2018, dados indicaram que a emissão de CO₂ advindos da produção de etanol de segunda geração foram inferiores aos de primeira, abaixo de 10 g de CO₂ por megajoule de energia produzida e 21 g de CO₂ por megajoule, respectivamente (CEISE, 2018), o que indica também seus benefícios com relação ao etanol de primeira geração.

Dessa maneira, a produção de etanol de segunda geração vem sendo feita com o emprego de diversas tecnologias, as quais estão em constante desenvolvimento, a fim de auxiliar nos problemas relacionados ao aumento da demanda de etanol, ao combate pelo uso das terras cultiváveis e ao aproveitamento dos subprodutos gerados na produção do etanol de primeira geração a partir da sacarose (PACHECO, 2011; HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). A tecnologia que vem sendo desenvolvida pode ser integrada às estruturas já existentes nas unidades produtoras, diminuindo, desse modo, os custos de instalação e operação (PACHECO, 2011). Ademais, destaca-se que a implantação da colheita mecanizada, a proibição da queima da palha da cana e a utilização de caldeiras de alto desempenho possibilitam inúmeras vantagens, além das

econômicas, para que haja um excedente de bagaço e palha os quais podem ser empregados na produção de etanol 2G (PACHECO, 2011). Estima-se que o aproveitamento desses subprodutos eleve a produção de etanol em 30 a 40% para uma área plantada similar (PACHECO, 2011).

O material lignocelulósico, disponível em grandes quantidades, é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Esse é uma abundante fonte de carboidrato e, dentre as mais empregadas e estudadas, está o bagaço da cana-de-açúcar o qual é constituído basicamente por celulose (41,7 a 45,3%), hemicelulose (31,6 a 34%) e lignina (12,6 a 16,5%) (AGUIAR, LUCENA, 2011). A celulose (Figura 1) é um polímero linear – formado por unidades conservativas de celobiose - não ramificado constituído por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, destaca-se que suas longas cadeias de glicose unidas originam microfibrilas que tornam a celulose resistente por conta das estruturas cristalinas e amorfas (não cristalinas) que as constituem.

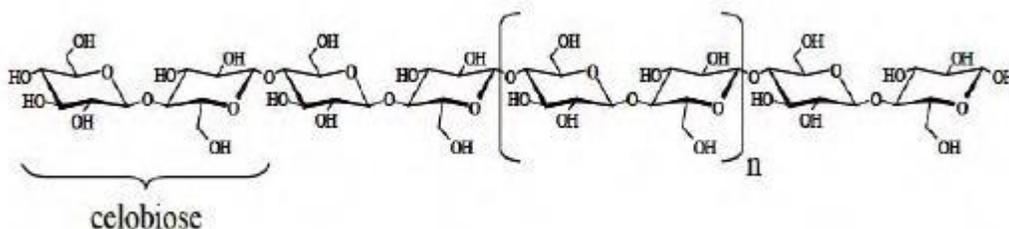


Figura 1 - Representação da celulose.
Fonte: RABONATO, 2013.

Diferentemente, a hemicelulose (Figura 2) é um heteropolissacarídeo formado por uma mistura complexa de açúcares ramificados, sendo sua principal constituinte a xilose, a qual é substituída por diferentes cadeias laterais, especialmente de unidades α -L-arabinosil e α -D-glucuronosil (ALOKIKA, SINGH, 2019; HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013; HOWARD *et al.*, 2003; PÉREZ *et al.*, 2002; RABONATO, 2013).

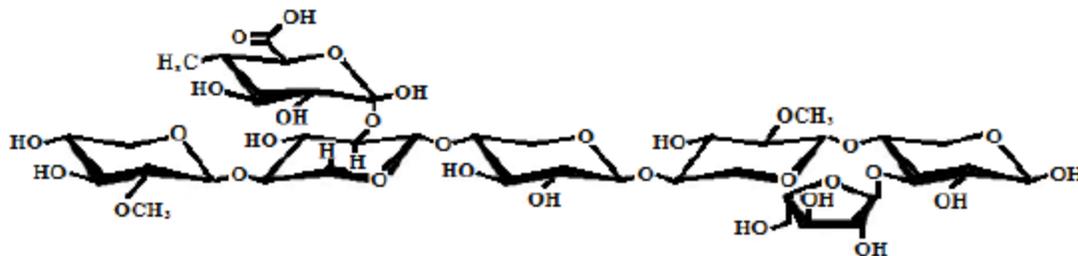


Figura 2 - Representação da hemicelulose.

Fonte: RABONATO, 2013

Por fim, a lignina – principal componente não-carboidrato da biomassa celulósica (Figura 3) é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanóides os quais são muito condensados e altamente resistentes à degradação (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013, RABONATO, 2013).

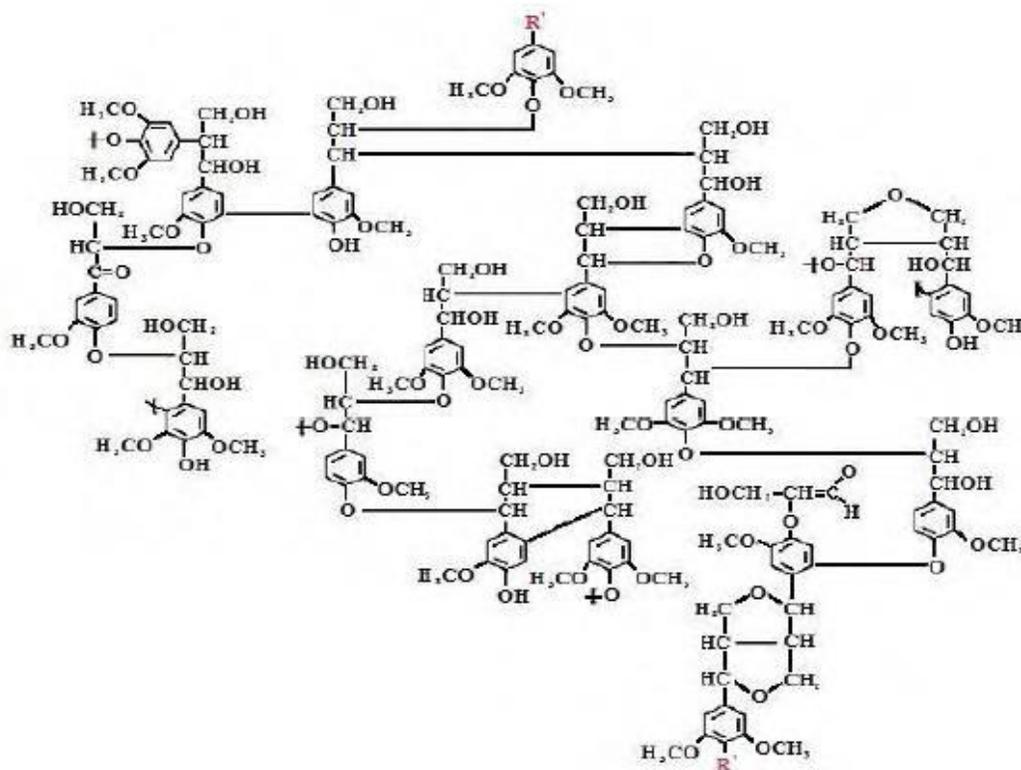


Figura 3 - Representação da lignina.

Fonte: RABONATO, 2013.

Para a quebra desse material lignocelulósico é necessária uma etapa de pré-tratamento que consiste na desestruturação deste complexo permitindo o acesso das enzimas que atuarão nos processos de quebra das fibras gerando açúcares

fermentescíveis (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Neste contexto, as etapas de pré-tratamento podem se dar de variadas formas: física, química, físico-química e biológica; sendo a biológica a melhor estratégia devido ao uso de menor energia no sistema e da reduzida poluição gerada (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Já as etapas de hidrólise podem ocorrer por rotas químicas ou enzimáticas, sendo que as enzimáticas são mais benéficas por conta de sua especificidade e menor geração de inibidores, os quais podem atrapalhar a fermentação.

O maior problema apresentado, é a dificuldade de acesso à celulose por conta da presença da estrutura rígida da lignina, a qual leva dificuldades ao processo de conversão (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Por conta disso, as etapas de pré-tratamento e hidrólise são essenciais e mais custosas no processo de bioconversão da lignocelulose, uma vez que envolvem diversos processos os quais possibilitam a desestruturação da lignina e empregam diferentes enzimas como as celulases - endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasases -, lacases e xilanases, por exemplo (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013).

A maior fração dos produtos originados com a quebra da hemicelulose, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, são as pentoses e a conversão dessas pentoses a etanol também é um problema que deve ser solucionado (CHANDEL *et al.*, 2011). Neste contexto, o grupo das xilanases contém uma das principais hemicelulases responsáveis pela hidrólise da ligação glicosídica do tipo β -1,4 capaz de produzir xilooligômeros curtos que são posteriormente hidrolisados em unidades de xilose simples por β -xilosidasases (HOWARD *et al.*, 2003).

As xilanases atualmente empregadas no mercado atuam em temperaturas ótimas com cerca de 50-55°C, que são temperaturas altas, as quais promovem elevados gastos energéticos no resfriamento da dorna para a fermentação subsequente (CAYETANO-CRUZ *et al.*, 2016; MANRICH, 2012). Assim, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de xilanases de baixo custo e alta eficácia para a produção de etanol e para a busca de melhores tecnologias de bioconversão de biomassa vegetal em produto útil para o fornecimento de energia (CHANDEL *et al.*, 2011; HOWARD *et al.*, 2003; MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2012).

1.2 Xilanase

Xilanase é um importante grupo de enzimas, o qual é responsável pela hidrólise da cadeia glicosídica de xilana gerando xilose e xilobiose - xilooligosacarídeos (ALOKIKA, SINGH, 2019). São necessários diferentes tipos de enzimas hidrolíticas com distintos modos de ação e especificidades para que haja a quebra completa da xilana (Figura 4) à monômeros por conta da sua complexa natureza química e diversidade de cadeias laterais (ALOKIKA, SINGH, 2019). Desse modo, as várias enzimas xilanólíticas são: endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase, α -glicuronidase e α -arabinofuranosidase (ALOKIKA, SINGH, 2019; MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2012).

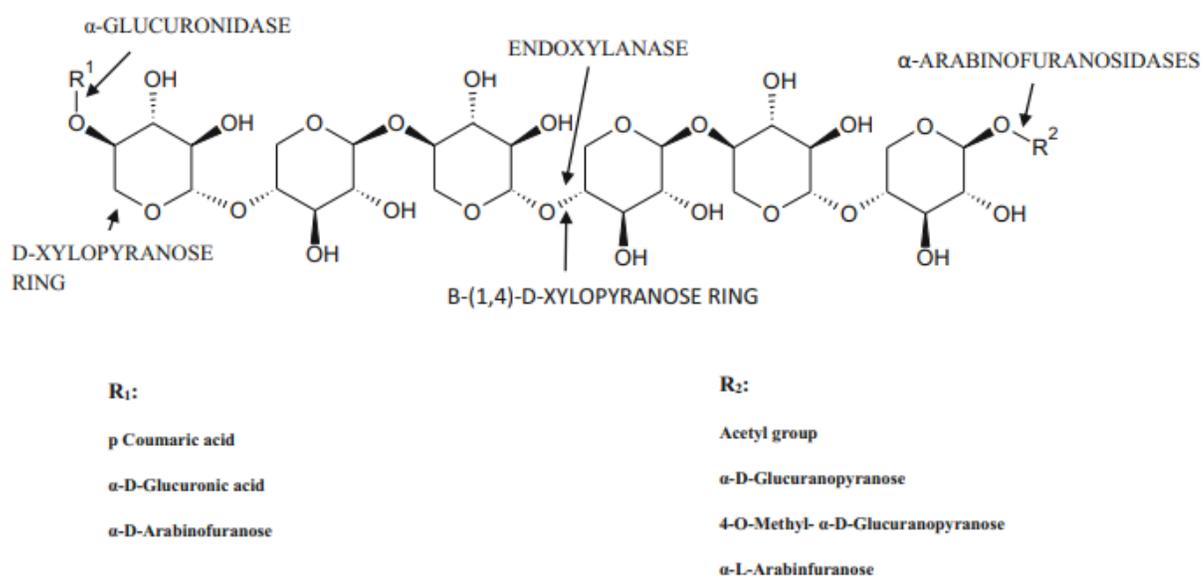


Figura 4 - Representação da estrutura da xilana e das enzimas necessárias para sua completa degradação. Evidencia-se também os grupos substituintes R₁ e R₂.
Fonte: ALOKIKA, SINGH, 2019.

Assim, em se tratando das funções de cada enzima na bioconversão da xilana salienta-se que a endo-1,4- β -xilanase cliva as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 produzindo pequenas frações de xilooligosacarídeos tais como a xilose, a xilobiose e a xilotriose com alto grau de polimerização (ALOKIKA, SINGH, 2019; KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018; HARRIS, RAMALINGAM, 2010). As ligações que serão hidrolisadas não são escolhidas de maneira randômica, mas sim a partir da análise das ramificações, do comprimento da cadeia e da presença de substituintes na molécula do substrato

(ALOKIKA, SINGH, 2019; KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018; HARRIS, RAMALINGAM, 2010). A β -xilosidase, por sua vez, realiza a clivagem das extremidades não redutoras dos xilooligossacarídeos, como os resíduos de xilose, por exemplo, sendo classificada a partir de suas afinidades relativas à xilobiase e a maiores xilooligossacarídeos (ALOKIKA, SINGH, 2019; HARRIS, RAMALINGAM, 2010). Já a α -glicuronidase é empregada na clivagem da ligação α -1,2-glicosídica entre o ácido α -glicurônico ou éter 4-O-metílico e a extremidade não redutora terminal da unidade xilopiranosil de pequenos xilooligossacarídeos (ALOKIKA, SINGH, 2019; HARRIS, RAMALINGAM, 2010). Por fim, a α -arabinofuranosidase é uma enzima responsável pela hidrólise dos resíduos terminais de arabinofuranosil de diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos (ALOKIKA, SINGH, 2019; HARRIS, RAMALINGAM, 2010).

A partir deste contexto, destaca-se a enzima endo-1,4- β -xilanase - também denominada xilanase -, a qual é a enzima extracelular mais importante na quebra das ligações glicosídicas β -1,4 da xilana formando produtos de grande interesse, é classificada, por meio de análises estruturais 3D, dentro das famílias das glicosil hidrolases F10 ou GH10 (Glycoside Hydrolase Family 10) e GH11 (Glycoside Hydrolase Family 11), sendo assim denominada por conta das reações químicas que catalisa e por ser uma enzima ativa de carboidrato – celulase (CAZY, 2021a; CAZY, 2021b). Além disso, tal enzima auxilia na quebra inicial da lignina presente nas fibras de celulose, uma vez que melhora a acessibilidade das enzimas à celulose em um substrato lignocelulósico através de aumentos no inchaço e na porosidade da fibra, melhorando significativamente eficiência hidrolítica (MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2012; GUPTA, BHUSHAN, HOONDAL, 2000; NI, TOKUDA, 2013). Isto, pois a xilanase apresenta a habilidade em clivar a ligação interna de xilana entre macromoléculas, facilitando a remoção da lignina em etapas seguintes (KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018; NI, TOKUDA, 2013). A xilanase pode ser encontrada em uma variedade de gêneros de bactérias e leveduras, além de em insetos, protozoários e algas marinhas e apresenta uma alta gama de aplicações tais como nas indústrias de papel, indústrias de alimentos, rações e bebidas e biocombustíveis (ALOKIKA, SINGH, 2019; KUMAR *et al.*, 2017; KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018; HARRIS, RAMALINGAM, 2010; MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2012).

Nas indústrias de papel e celulose sua aplicação surge como uma alternativa para a redução da presença de compostos químicos mutagênicos e carcinogênicos, os quais causam altos índices de poluição ambiental; assim, consegue-se diminuir de 10-50% a presença do cloro, além de tornar menores os danos nas fibras de celulose durante o processo, o que eleva a qualidade do papel (ALOKIKA, SINGH, 2019; MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2019). Já nas indústrias de alimentos, bebidas e rações observa-se seu emprego na melhora da qualidade de pães, uma vez que possibilita o aumento de seu volume a partir da quebra das hemiceluloses presentes na farinha de trigo, o que permite uma redistribuição de água na massa; aumento da qualidade e quantidade de suco por meio da redução da viscosidade e estabilização da polpa das frutas; e nas rações, destaca-se que são dietas ricas em lignocelulose, desse modo, o uso da enzima leva à um aumento nutricional (ALOKIKA, SINGH, 2019; KUMAR *et al.*, 2017; KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018; HARRIS, RAMALINGAM, 2010). Em se tratando dos biocombustíveis, destaca-se a degradação da biomassa lignocelulósica visando a produção de etanol; isto a partir da conversão de açúcares por meio da deslignificação a qual permite a liberação da celulose e da hemicelulose que serão despolimerizadas, a fim de gerar açúcares livres que serão fermentados para produzir o etanol desejado (ALOKIKA, SINGH, 2019). Por isso, é necessário um coquetel enzimático, no qual a xilanase está presente, para promover a hidrólise da biomassa no processo (ALOKIKA, SINGH, 2019; KUMAR, DANGI, SHUKLA, 2018).

1.3 *Heterotermes tenuis*

Heterotermes tenuis é um cupim subterrâneo que integra a ordem Isoptera e a família Rhinotermitidae. Os cupins ou térmitas pertencentes a esta família são classificados como “cupins inferiores” por apresentarem uma diferença filogenética dos considerados “cupins superiores”, fato este que pode estar associado a hábitos alimentares de cada espécie. Em se tratando das características gerais, destaca-se que os organismos desta espécie habitam galerias difusas no solo, abaixo de rochas, o interior de raízes e troncos, e, caso precisem passar em lugares expostos, constroem túneis com detritos vegetais, solo e fezes, em ambientes terrestres tropicais, florestas úmidas, savanas e regiões desérticas (COSTA-LEONARDO, 2002; LIMA, COSTA-

LEONARDO, 2007). Além disso, sua nutrição é baseada no material lenhoso em variadas fases de decomposição e em partes vitais das plantas, como o sistema radicular e os entrenós, em diversos estágios de crescimento, da cana-de-açúcar (LIMA, COSTA-LEONARDO, 2007).

Os adultos estéreis - casta estéril -, operários e soldados, dispõem desenvolvimento sexual incompleto. A cabeça dos soldados é mais volumosa e sua mandíbula é bem mais desenvolvida, quando comparada aos operários (Figura 5), desse modo, são encarregados da proteção e defesa da colônia. Já os operários representam a maior parte da sociedade e exibem variados tamanho, largura de cabeça e número de artigos antenais. Ademais, são responsáveis por cavar túneis, proteger as ninfas e coletar alimentos, sendo responsáveis pelas atividades básicas e essenciais do cupinzeiro. Os adultos férteis - casta fértil -, rei e rainha, por sua vez, apresentam quatro asas aladas e membranosas. Um fato interessante é que tais asas se destacam facilmente do corpo, o que ocorre na revoada, período no qual os alados copulam e buscam um local no solo para iniciar o novo ninho. Tanto os adultos férteis, quanto os inférteis mencionados, apresentam o mesmo fenótipo branco-amarelado, além de ambos serem isentos de olhos e ocelos. Dessa maneira, são considerados fototrópicos negativos e possuidores de quimiorreceptores na extremidade das antenas os quais atuam conjuntamente à pêlos sensoriais distribuídos pelo corpo (COSTA-LEONARDO, 2002; ELEOTÉRIO, 2000; LIMA, COSTA-LEONARDO, 2007).

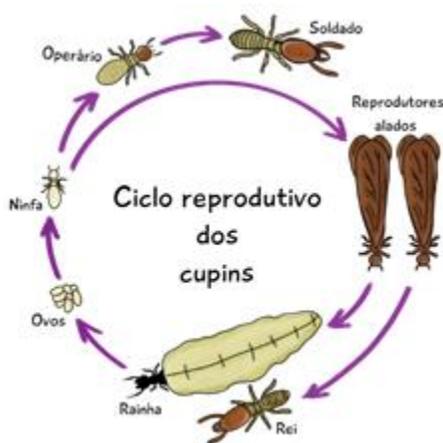


Figura 5 - Ciclo reprodutivo em cupins. Morfologia dos cupins em um cupinzeiro e representação do ciclo de vida.

Fonte: Adaptado de: "Paramount pestcontrol"
 <http://paramountpestcon.blogspot.com.br/2015_03_01_archive.html> apud GONÇALVES, 2017.

Os cupins por apresentarem metamorfose incompleta, são considerados insetos hemimetábolos. Dessa forma, o estágio pós-embriônico, que compreende o período desde a eclosão dos ovos até a formação do indivíduo adulto, é dividido em vários outros estágios os quais incluem as formas de desenvolvimento dessa espécie até sua forma final (Figura 5). O primeiro estágio é o dos ovos dos quais se originam os primeiros jovens, pertencentes ao segundo estágio. Esses são imaturos e mesmo possuindo diversas diferenças morfológicas são bem parecidos com os adultos. Tais jovens passarão para a fase de desenvolvimento e para isso sofrerão diversas ecdises e, em um determinado ínstar - intervalo entre duas ecdises -, haverá a formação das ninfas, originando o terceiro estágio de desenvolvimento (COSTA-LEONARDO, 2002). Tais ninfas sofrerão novas transformações e darão origem a novos membros na colônia, como operários, soldados, reprodutores de substituição e reprodutores alados, estes pertencentes ao último estágio do desenvolvimento (Figura 5) (COSTA-LEONARDO, 2002). Destaca-se que, monitoramentos realizados na colônia desta espécie indicaram que, após a formação do casal, os primeiros ovos depositados – de 8 a 9 por colônia, que não são colocados todos no mesmo dia – surgem depois de 8 a 12 dias; as primeiras “larvas” após 40 dias, o primeiro operário pigmentado depois de 120 dias e o primeiro soldado após 150 da formação dos pares (COSTA-LEONARDO, 2002).

Essa espécie é nativa do Brasil, comum em áreas de cerrado e habitualmente avistada em troncos caídos e sob a casca de árvores mortas, contudo, observa-se também a ocupação de ninhos construídos por outras espécies (COSTA-LEONARDO, 2002). As térmitas são caracterizadas por serem mastigadores e por possuírem pernas ambulatórias, que são adaptadas para a locomoção terrestre. Definem-se como insetos eusociais, uma vez que em sua sociedade, coexistem indivíduos de castas morfofisiologicamente distintas, cada um com sua respectiva função dentro do cupinzeiro (COSTA-LEONARDO, 2002; ELEOTÉRIO, 2000; LIMA, COSTA-LEONARDO, 2007).

Neste contexto, salienta-se que a espécie *Heterotermes tenuis* é conhecida como uma das principais espécies-praga da cana-de-açúcar devido ao seu ataque agressivo, o qual causa danos aos toletes, destruição das gemas laterais e ataques às raízes da planta (MIRANDA, VASCONCELLOS, BANDEIRA, 2004; CASARIN, COSTA-

LEONARDO, ARAB, 2008). Assim, destaca-se o potencial enzimático deste cupim na busca por enzimas as quais realizam a degradação da celulose e da hemicelulose, uma vez que, além de ser espécie-praga, este cupim executa a quebra das fibras lignocelulósicas com fins alimentares e em temperaturas de forrageio baixas (ELEOTÉRIO, 2000; LIMA, COSTA-LEONARDO, 2007). Dessa maneira, além do auxílio na degradação da lignina e da hemicelulose rica em xilana no bagaço da cana-de-açúcar, a xilanase está inserida em outros processos importantes no cupim, tais como na digestão dos compostos lignocelulósicos que ocorre no intestino grosso (ARAKAWA *et al.*, 2009; DHEERAN *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O surgimento de novas políticas públicas, a fim de impulsionar a produção e o comércio de biocombustíveis, somado às já existentes e contínuas preocupações com o meio ambiente e à necessidade da redução da emissão de gases efeito estufa criaram um ambiente mais encorajador para a tomada de medidas relacionadas a busca por fontes renováveis. Isto, pois atrelado a esta produção estão inúmeras possibilidades de diminuir os problemas energéticos e ambientais por auxiliar no emprego da sustentabilidade, além da contribuição na busca por uma nova estabilidade econômica pós pandemia.

Neste contexto, o Brasil surge como um dos principais agentes na produção, tanto de etanol de primeira, quanto de segunda geração, devido ao cenário em que se insere. Assim, a cana-de-açúcar e o uso de seus subprodutos – bagaço e palha - para a geração de energia são o foco neste momento, pois a partir deles podem-se originar açúcares fermentescíveis que são de enorme interesse para a indústria de biocombustíveis. O fato de serem ricos em lignocelulose, faz com que sejam necessárias etapas de quebra das fibras para externar cada um desses componentes – celulose e hemicelulose – dos quais a hemicelulose é a segunda mais abundante. Assim, enzimas como a endo-1,4- β -xilanase são necessárias para a clivagem dessa hemicelulose e obtenção dos açúcares.

O cupim da espécie *Heterotermes tenuis* surge como potencial fonte de enzimas, dentre elas a xilanase, uma vez que esse inseto, principal praga da cana-de-açúcar,

recebe seu destaque por conseguir degradar o material lignocelulósico em sua alimentação, além de fazer uso de uma baixa temperatura de forrageio. Dessa maneira, um estudo do transcriptoma do cupim realizado por nosso grupo (CAMPANINI *et al.*, 2020) permitiu identificar possíveis sequências correspondentes à xilanases – ao todo 9 – diferentes das já conhecidas. Destaca-se que a origem das enzimas não está totalmente elucidada, uma vez que pode ser do próprio cupim ou de microrganismos endossimbiontes, como protistas. Fato este que justifica o título do trabalho que menciona o (meta)transcriptoma do cupim.

Neste sentido, a busca por novas xilanases pode contribuir significativamente nessa área, uma vez que enzimas que atuem em melhores condições de temperatura e pH auxiliarão na eficiência da quebra da estrutura da xilana na etapa de hidrólise, reduzirão custos de energia dos produtores e tornarão mais elevadas as quantidades de açúcar produzidos e disponíveis na etapa de fermentação, deixando, assim, o processo mais econômico e viável (ALOKIKA, SINGH, 2019). Com isso, mediante os resultados a serem alcançados neste trabalho, busca-se transpor diversos obstáculos na aplicação comercial dessa enzima e procedimentos mais baratos que a envolvem, melhorando as técnicas por meio do uso de enzimas com uma melhor atividade que as atualmente disponíveis no mercado.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a clonagem e expressão de uma xilanase presente no (meta)transcriptoma da espécie *Heterotermes tenuis* (Rhinotermitidae) para possível aplicação biotecnológica. Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho são:

- (i) Analisar os dados do (meta)transcriptoma de cupins operários da espécie *Heterotermes tenuis*, definindo a sequência da xilanase que será amplificada a partir dessa região codificadora;
- (ii) Realizar análises *in silico* a fim de melhor analisar a sequência escolhida;
- (iii) Amplificar a região codificadora do gene;

- (iv) Clonar e expressar essa proteína em sistemas heterólogos dispondo da levedura *Pichia pastoris* como modelo;
- (v) Isolar e purificar a enzima.

4 METODOLOGIA

4.1 Cupins

Para a realização deste trabalho, foram utilizados cupins selecionados da casta operário da espécie *Heterotermes tenuis*, cedidos pelo grupo liderado pela Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo da UNESP de Rio Claro.

4.2 Iniciadores para a amplificação da sequência codificadora da enzima e análises *in silico* para produção heteróloga

Os iniciadores, também denominados *primers*, para a amplificação da sequência codificadora de xilanase, foram desenhados por meio da ferramenta *NEB Assembly Tool*. Isso foi feito com base nas sequências encontradas na biblioteca de cDNA já construída e sequenciada, com uso do sequenciamento de última geração, realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

Para as análises iniciais *in silico* foram empregados os programas *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e *YingOYang* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>), que objetivaram a predição da estrutura da enzima, bem como análises de hidrofobicidade, presença de sítios de glicosilação e fosforilação, além de análises da presença ou ausência do peptídeo sinal por meio do *SignalP-5.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os cupins operários foram inicialmente separados (50-80 insetos), em seguida, pulverizados em nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de Trizol® (Invitrogen) para extração total do RNA, os cupins foram macerados com auxílio de

pistilos. Após homogeneização, centrifugou-se os tubos (12.000 x g 4°C) por 10 minutos e os respectivos sobrenadantes foram transferidos para novos tubos contendo 200 µL de clorofórmio. Tais tubos foram submetidos a agitação em vórtex e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados (12.000 x g a 4°C) por 15 minutos. Repassou-se os sobrenadantes formados para novos tubos contendo 200 µL de clorofórmio, os quais seguiram novamente para a agitação em vórtex e centrifugação (12.000 x g a 4°C) por 15 minutos. Adicionou-se ainda 500 µL de isopropanol para a precipitação do RNA e, em seguida, agitou-se em vórtex e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram, em seguida, centrifugados (12.000 x g 4°C) por 10 minutos e os sobrenadantes formados foram descartados. Aos *pellets* acrescentou-se 1 mL de etanol 75% (v/v água) e os tubos foram agitados e centrifugados (7.500 g a 4°C) por 5 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os precipitados ressuspensos em água ultrapura (dieltilpirocarbonato, DEPC 0,2% v/v). A amostra foi quantificada no espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e, para verificação da integridade do RNA após extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2%.

Após a extração, 2000 ng de RNA foi utilizada para a síntese do cDNA utilizando *SuperScript™III Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Seguindo as recomendações do fabricante. Destaca-se que a eficiência da síntese foi verificada pela amplificação de um fragmento do gene referência da β-actina.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a síntese do cDNA, os fragmentos que codificam a xilanase foram amplificados com a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/L) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), em em Termociclador automático C1000 Touch™ Thermal Cycler - Bio-Rad®. Isto utilizando ciclos que foram determinados em base a temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer*. A verificação da amplificação foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% com de corrida tampão TAE 1X a 100 V por 30 minutos.

4.5 Purificação dos fragmentos oriundos de PCR para clonagem e ligação do inserto ao vetor

Para a purificação das amostras amplificadas, realizaram-se recortes com um bisturi no gel de agarose, a fim de separar apenas as bandas correspondentes à amplificação da xilanase. Assim, após a separação dessas, utilizou-se o *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, a amostra foi ressuspensa em água ultrapura tratada e quantificada em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), objetivando determinar qual seria a concentração ideal a ser utilizada na montagem do vetor recombinante.

4.6 Clonagem e subclonagem

4.6.1 Reação de ligação do inserto ao pGEM®-T Easy

Para a reação de ligação empregou-se o sistema pGEM®-T *Easy* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Este sistema é conveniente para clonar produtos de PCR gerados por polimerases termoestáveis que adicionam uma única desoxiadenosina às extremidades do fragmento amplificado. O pGEM®-T *Easy* contém extremidades 3'-T no local de inserção fornecendo uma extremidade compatível para produtos de PCR.

4.6.2 Preparo de células eletrocompetentes *E. coli* DH5- α

A linhagem de *E. coli* DH5- α foi previamente inoculada em LB ágar por 24 horas a 37°C. Desta placa, foi inoculada uma única colônia isolada em 30 mL de meio LB a 37°C sob agitação constante de 200 rpm por de 2 horas até se atingir o valor de densidade óptica (D.O.) entre 0,3 e 0,4 nm. Após atingir a D.O. ideal, o inóculo foi incubado em banho de gelo para parar o crescimento das células, seguido de centrifugação a 4000 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa, cuidadosamente, em 10,5 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado. Todo o volume foi

centrifugado a 3500 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2,4 mL de CaCl₂ 0,1 M e glicerol 50% também gelado.

Foram feitas alíquotas de 200 µL dessa suspensão celular em microtubos os quais foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C.

4.6.3 Transformação em *E. coli* DH5-α (pGEM®-T Easy + inserto purificado)

Todo o volume da reação de ligação foi adicionado a um microtubo com 200 µL de uma solução contendo células DH5-α eletrocompetentes, seguindo orientações do manual do pGEM®-T Easy (Promega). Em seguida, o microtubo foi incubado em banho-maria por 1 minuto e 30 segundos. Após esse período, o microtubo foi colocado, imediatamente, no gelo. Depois do choque térmico, 800 µL de meio LB foram acrescentados ao microtubo e este foi incubado a 37°C por 1 hora a 80 rpm.

Paralelamente, preparou-se duas placas de meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL), às quais foi adicionado X-gal (40 µg/µL) e IPTG. Com auxílio de alça de Drigalski, 200 µL das células transformadas foram espalhadas em cada placa, que foram, posteriormente, incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.6.4 PCR das colônias transformantes e extração de DNA plasmidial após transformação

Para identificação dos clones recombinantes foi realizada uma PCR de 10 colônias brancas utilizando os *primers* do gene de interesse.

Após isolamento, um clone positivo foi cultivado em meio LB na presença de ampicilina. Os inóculos foram incubados em aparelho agitador a 37°C, 200 rpm, *overnight*. Posteriormente, foi realizada a *miniprep* dos plasmídeos com o *Kit QIAprep® Spin Miniprep*, após esse tratamento, as amostras foram corridas em gel de agarose 1% para avaliar a integridade do DNA e quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

4.6.5 Reação de digestão com enzimas de restrição

Para confirmação da construção realizou-se uma reação de clivagem com as enzimas de restrição *Xba*I e *Not*I (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Foi feita a digestão da construção pGEM®-T *Easy* + inserto purificado e do pPICZαA vazio, para otimizar a reação de ligação será executada posteriormente. Para confirmar a digestão realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X a 70 V por 30 minutos.

Após a corrida, a visualização foi feita em fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (BioRad®, Hercules, CA, EUA).

4.6.6 Reação de ligação do inserto ao pPICZαA

Para a reação de ligação foram seguidas as orientações do manual do vetor (Invitrogen). Utilizou-se 220 ng do DNA plasmidial, 50 ng do vetor pPICZαA, 1 μL da enzima *T4 DNA ligase*, 3 μL do tampão *T4 ligase* e completou-se o volume da reação para 30 μL.

A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e, posteriormente, armazenada a -20°C.

4.6.7 Transformação em *E. coli* DH5-α (pPICZαA + inserto purificado)

Foi adicionado 15 μL do volume da reação de ligação a um microtubo contendo uma solução de 200 μL de células DH5-α eletrocompetentes. Em seguida, o microtubo foi colocado em banho-maria por 1 minuto e 30 segundos e, depois, colocado imediatamente no gelo. Após o choque térmico, adicionou-se 800 μL de meio *Low Salt* (LS) e o microtubo foi incubado a 37°C por 1 hora a 80 rpm.

Paralelamente, foram preparadas duas placas de meio LS contendo zeocina (100 μg/mL). Com auxílio de alça de Drigalski, 200 μL da solução contendo as células transformadas foram espalhadas em cada placa as quais foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.6.8 PCR das colônias transformantes e Extração de DNA plasmidial após transformação

Para identificação dos clones recombinantes foi realizada uma PCR de 20 colônias brancas utilizando os *primers* da xilanase.

Após tal identificação, um clone positivo foi cultivado em meio LS na presença de zeocina. Os inóculos foram então incubados sob agitação em aparelho agitador a 37°C, 200 rpm, *overnight*. Depois deste período, fez-se a *miniprep* dos plasmídeos com o *Kit QIAprep® Spin Miniprep* e, em seguida, as amostras foram corridas em gel de agarose 1% para avaliar a integridade do DNA e quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

4.6.9 Reação de Linearização do plasmídeo (pPICZαA + xilanase)

Para a reação de linearização empregou-se 2000 ng do vetor pPICZαA + xilanase, 5 µL do tampão B, 1,5 µL da enzima *PmeI* e completou-se o volume para 50 µL. Tal reação foi incubada a 37°C, *overnight*.

Após este período, correu-se um gel de agarose 1% para verificar a linearização. A reação foi inativada a 65°C por 20 minutos no termobloco (Kasvi) e armazenada a -20°C.

4.6.10 Precipitação do DNA

Acrescentou-se na reação de linearização 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M com pH 5,2. A amostra foi homogeneizada e nesta adicionou-se 2,5 volumes - considerando o volume de DNA + acetato de sódio - de etanol 100% gelado. Verceu-se a reação e esta foi colocada no -20°C por duas horas.

Em seguida, a amostra foi submetida a centrifugação por 20 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Posteriormente, o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugada a 13000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e deixou-se o microtubo secar a temperatura

ambiente; após este período, o *pellet* foi ressuspendido em água *nuclease free*. Para verificação da etapa de precipitação correu-se um gel de agarose 1%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises *in silico* para produção heteróloga

As análises *in silico* da xilanase foram feitas de forma paralela aos primeiros experimentos laboratoriais e objetivavam melhor explorar a possível sequência a ser utilizada nesses, bem como melhor embasar a escolha do organismo de expressão da proteína. Assim, dentre as 9 sequências identificadas como xilanases, a partir do estudo do transcriptoma do cupim, uma foi escolhida por apresentar melhor pontuação e melhor caracterização.

Nesse sentido, os resultados das análises *in silico* (DADOS EM SIGILO DE PUBLICAÇÃO) permitiram, além de analisar a estrutura da proteína em questão, prever seu dobramento, por meio da investigação dos seus aminoácidos, e suas formas de interação a partir da observação de regiões polares, apolares e hidrofóbicas, por exemplo.

No detalhamento indicado pela predição das sequências de aminoácidos da xilanase escolhida observaram-se as informações de 2 alfa hélices, 16 folhas beta, 17 regiões *coil* e de regiões de interação com a membrana celular. Além disso, a predição também forneceu dados a respeito da presença de 49 pequenas cadeias laterais apolares e 34 polares, 25 hidrofóbicas e 24 aromáticas com cisteína.

A partir desses ensaios, outros resultados obtidos incluíram a obtenção de um gráfico que ilustra as previsões de vários sítios de glicosilação e de fosforilação ao longo da sequência. Assim, o eixo X representou a sequência da região N-terminal para a C-terminal em pulsos verticais correspondentes aos potenciais locais de O-GlcNAc. Além disso, indicaram-se os locais de sítios *Ying/Yang* (Ser/ Thr) que podem ser fosforilados.

Neste sentido, a última análise realizada foi a do peptídeo sinal. Tal análise permitiu verificar sua presença nos primeiros 16 aminoácidos da sequência e possibilitou o correto desenho dos *primers* para clonagem e expressão da xilanase. Assim, retirou-se essa parte da sequência a fim de não existir um endereçamento

próprio da proteína, somente o fator alfa do vetor de expressão, o qual é responsável por externar as proteínas produzidas pela *Pichia pastoris*.

Com esses dados, embasou-se a escolha da levedura *Pichia pastoris*, a qual é um organismo comumente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes, uma vez que ela é capaz de realizar as modificações pós-traducionais necessárias para a sua correta atividade e de externar as proteínas de interesse produzidas. Destaca-se que por conta do Sigilo necessário para este trabalho, alguns dados foram emitidos, a fim de não prejudicar futuras publicações do grupo de pesquisa.

5.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foi feita a extração do RNA em várias amostras de cupins operários da espécie *Heterotermes tenuis* (Figura 6), assim, aqueles que apresentaram melhor concentração e que não se observou degradação foram escolhidos para a síntese de cDNA. Realizou-se a análise da integridade a partir da observação dos fragmentos 18S e 28S do rRNA. Destaca-se que estudos demonstraram que amostras de ácidos ribonucleicos de insetos podem apresentar uma “quebra oculta” do fragmento 28S em dois pedaços de tamanhos parecidos, os quais migram juntamente com a porção 18S e não devem ser interpretados como degradação, uma vez que se trata apenas de uma particularidade deste tipo de RNA (WINNEBECK *et al.*, 2010; MACHARIA, OMBURA, AROKO, 2015).

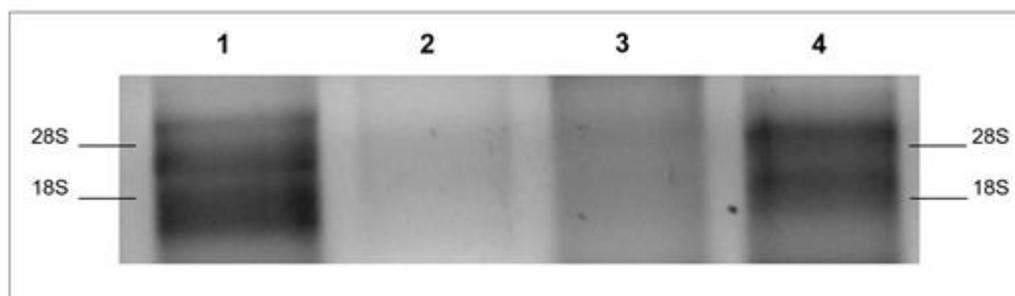


Figura 6 - Avaliação da integridade do rRNA por gel desnaturante. Amostras que apresentaram as porções 28S e 18S, foram consideradas íntegras (1 e 4) e aquelas que não apresentaram uma quantificação desejada foram separadas (2 e 3).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, os RNAs que apresentaram melhor concentração e integridade foram transcritos e empregados na reação em cadeia da polimerase, que, inicialmente, objetivou à amplificação do fragmento correspondente ao gene referência da β -actina, o qual é usado, em nosso laboratório, como controle positivo da amplificação, uma vez que apresenta expressão estável e pode ser utilizado como controle (Figura 7).

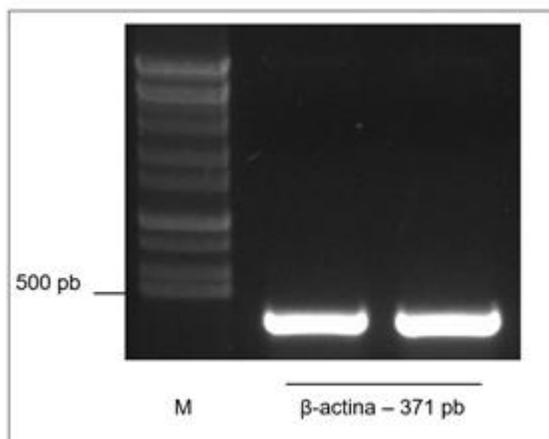


Figura 7 - Teste de integridade de cDNAs por meio da amplificação de um fragmento do gene referência da β -actina (371 pb). Após a síntese do cDNA, as amostras foram submetidas à amplificação para serem testadas, assim, obteve-se um fragmento de tamanho esperado de 371 pb. A figura indica dois exemplos de amplificações a partir de RNA extraído de cupins operários da espécie *Heterotermes tenuis*. Destaca-se que M corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb (Cellco).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Assim, a partir da confirmação da correta síntese do cDNA, buscou-se à amplificação do fragmento correspondente ao gene da xilanase, adaptando os ciclos da reação em cadeia da polimerase. As alterações realizadas relacionaram-se à temperatura de anelamento e ao tempo necessário para a amplificação da sequência completa correspondente ao gene, uma vez que o gene da xilanase apresenta um maior número de nucleotídeos que o gene referência da β -actina. Assim, após variados testes e alterações de protocolo, foi possível obter a amplificação (Figura 8).

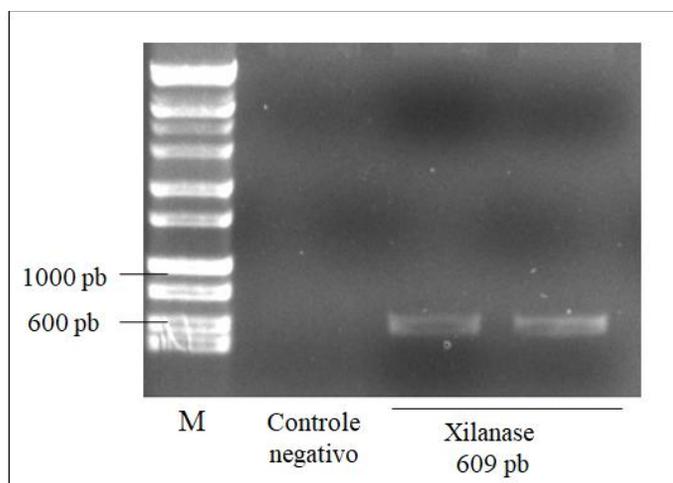


Figura 8 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene da xilanase (609 pb). Teste realizado com a presença do controle negativo, que não amplificou, o que auxiliou a comprovar a correta elaboração da reação e à amplificação do gene referente à enzima de interesse. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Cellco).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Destaca-se que tais amostras foram levadas para sequenciamento e obteve-se resultados satisfatórios para os *amplicons* correspondentes à região referente à xilanase. Ademais, destaca-se que foram realizados alinhamentos a partir da ferramenta BLAST, tanto comparando a sequência obtida pelo sequenciamento que corresponde à região codificante da xilanase com a obtida no transcriptoma estudado pelo nosso grupo, quanto com a mesma sequência obtida pelo sequenciamento com o banco de dados. Esta última análise resultou no alinhamento com uma sequência correspondente à uma xilanase de protista; fato este, que também embasou o título do trabalho, melhor justificando a possível origem da enzima em questão. Além disso, novos sequenciamentos serão realizados de modo a comprovar a ausência total de mutações e complementar os resultados já alcançados. Devido à conjuntura de pandemia tais dados ainda não foram obtidos, contudo, estão em fase de elaboração.

5.4 Clonagem e subclonagem

5.4.1 Clonagem no pGEM®-T Easy

Após padronização da reação de PCR e da purificação da xilanase, iniciaram-se os ensaios de clonagem. Desta maneira, realizou-se uma reação de ligação (pGEM®-T

Easy + xilanase purificada) e, posteriormente, foi feita a transformação em células eletrocompetentes de *E. coli* DH5- α .

O vetor pGEM®-T *Easy* apresenta o gene que codifica a β -galactosidase em seu cassete, desse modo, a atividade dessa enzima pode ser detectada quando as células são cultivadas em placas contendo o glicosídeo artificial X-gal. Tal substrato é clivado pela enzima β -galactosidase e produz galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindole-1, que sofre oxidação espontânea e origina um produto de coloração azul. Caso a expressão da β -galactosidase seja interrompida em decorrência da inserção do fragmento correspondente ao gene de interesse (xilanase) no plasmídeo, essa hidrólise não ocorre e as colônias apresentam-se brancas (ROBLES, DOERS, 1994; KOBBS, 1997).

Neste sentido, para confirmação dos clones recombinantes, realizou-se a PCR de colônia (Figura 9), conforme descrito, anteriormente, na metodologia.

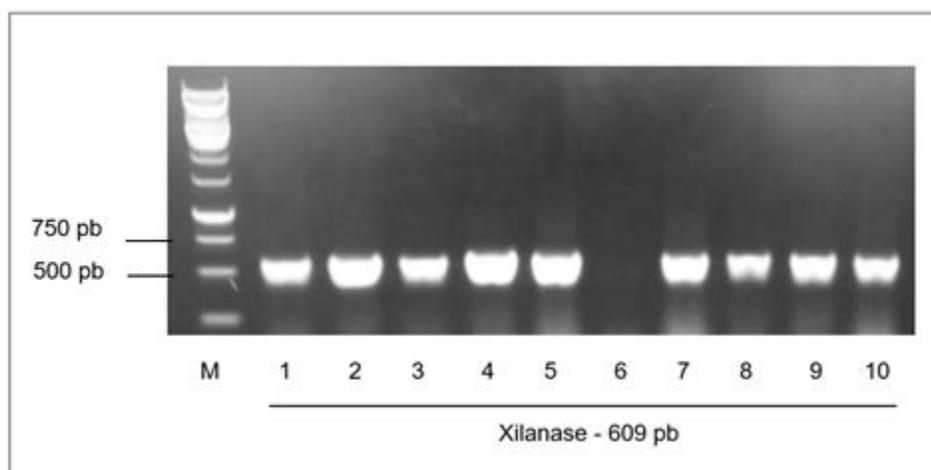


Figura 9 - PCR de colônia para confirmar as colônias recombinantes. Fez-se a PCR de 10 colônias supostamente recombinantes (numeradas de 1 a 10). Apenas a colônia 6 não apresentou amplificação do tamanho de fragmento esperado. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com as colônias recombinantes definidas (colônias 2, 4, 5 e 7), foram feitos 4 inóculos e, em seguida, as minipreparações - *minipreps* - destes. Em se tratando das *minipreps*, destaca-se que esta contém 3 passos com 3 soluções distintas, as quais apresentam diferentes objetivos, a fim de, ao final se obter apenas o plasmídeo clonado. A solução 1 contém Tris/ EDTA que estabiliza o DNA por ser uma solução tampão; já a

solução 2 promove a lise alcalina das membranas por meio da ação do SDS/NaOH; por fim, a solução 3 ocasiona a precipitação dos lisados membranosos por meio da adição de acetato de potássio em alta molaridade, separando o DNA no sobrenadante.

Para confirmar a construção pGEM®-T Easy + xilanase elaborou-se reações de digestão com enzimas de restrição *NotI* e *XbaI* (Figura 10), cujos sítios foram previamente analisados e não estavam presentes na xilanase. Destaca-se, contudo, que uma nova digestão será feita e que, mesmo com esta figura não tão satisfatória, foi possível a comprovação da digestão das enzimas e da presença do fragmento de interesse que corresponde à xilanase.

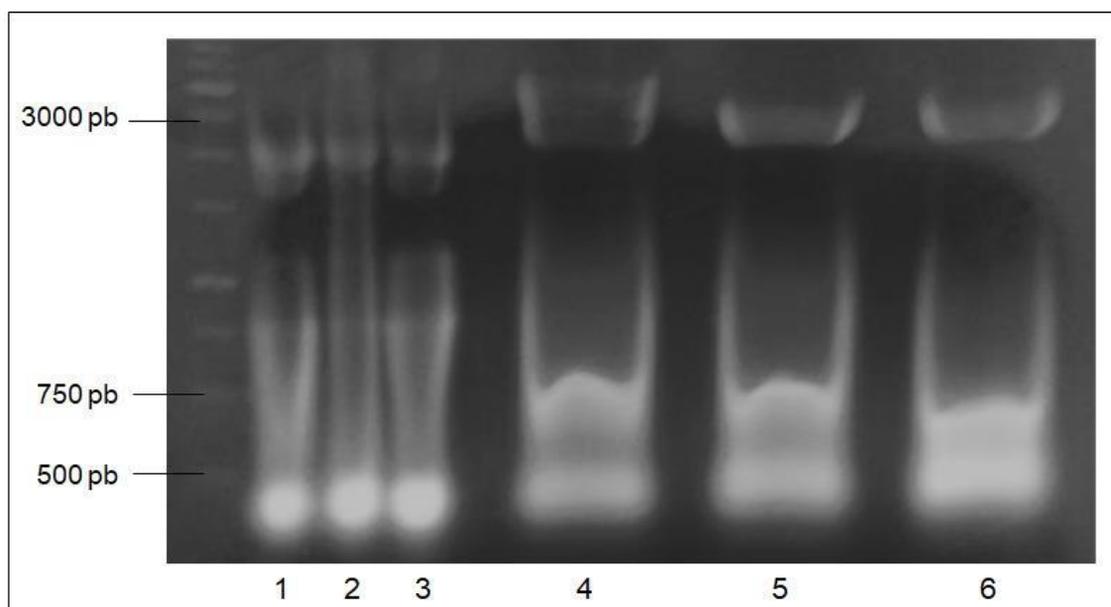


Figura 10 - Reação de digestão com *NotI* e *XbaI*. As amostras 1, 2 e 3 são a construção pGEM®-T Easy + xilanase fechada. E as amostras 4, 5 e 6 são as amostras tratadas com as enzimas de restrição, evidenciando a formação de 2 fragmentos correspondentes ao plasmídeo (3000 pb) e ao fragmento correspondente a xilanase (609 pb). Fez-se uso do marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após visualização do resultado, optou-se por purificar do gel as amostras 5 e 6, que se apresentaram no tamanho esperado da xilanase (609 pb) a fim de dar continuidade nos experimentos de clonagem no pPIZ α A.

5.4.2 Subclonagem no pPICZ α A

Para a subclonagem, seguiu-se os mesmos passos descritos para o pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy. Desse modo, iniciou-se com a reação de ligação (pPICZ α A + xilanase purificada), seguida pela transformação em células eletrocompetentes de *E. coli* DH5- α .

Destaca-se que o vetor PICZ α A (3,6 Kb) (Figura 11) é comumente empregado na expressão e secreção de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*. Tal vetor é constituído por: promotor de AOX1 para expressão fortemente regulada e induzida por metanol do gene de interesse, sinal de secreção do fator α que direciona a proteína recombinante para o meio extracelular e gene de resistência a zeocina para seleção em *E. coli* e *P. pastoris* (KOUTZ *et al.*, 1989; BARON *et al.*, 1992; DROCOURT *et al.*, 1990). Além disso, apresenta peptídeo C-terminal contendo o epítipo *c-myc* e uma cauda de poli-histidina para detecção e purificação da proteína recombinante, bem como três quadros de leitura para facilitar a clonagem.

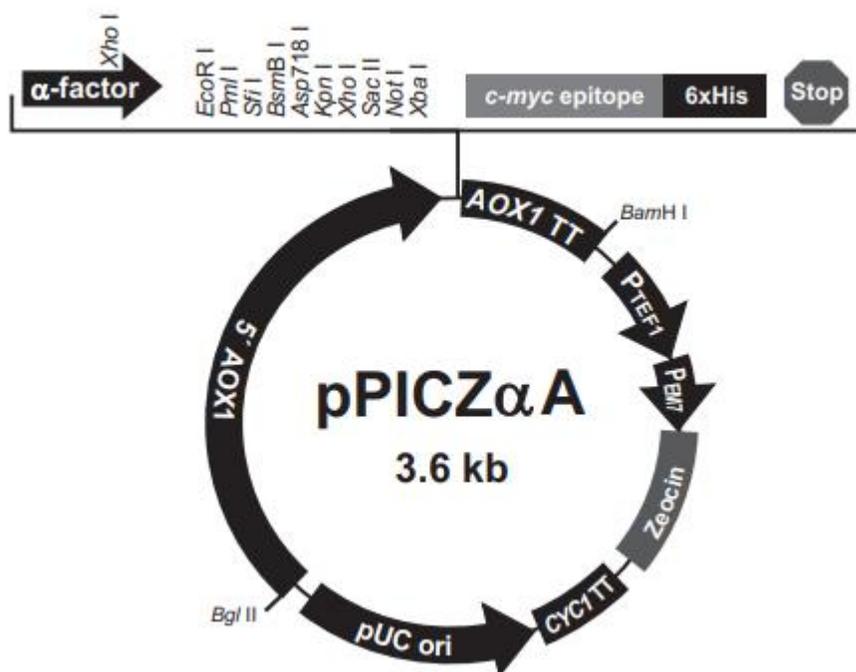


Figura 11 - Mapa do vetor pPICZ α A. Indicando as regiões correspondentes ao promotor AOX1, o sinal de secreção α , o gene de resistência à zeocina, as possíveis enzimas de restrição que podem ser empregadas, o peptídeo C-terminal contendo o epítipo *c-myc* e a cauda de poli-histidina.

Fonte: Adaptado de: Invitrogen. Disponível em: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf. Acesso em: 13 jan. 2021.

Assim, para confirmar a presença de clones recombinantes realizou-se a PCR de colônia (Figura 12), a qual considerou positivas as amostras que apresentaram um *amplicon* do tamanho esperado para o gene analisado (609 pb).

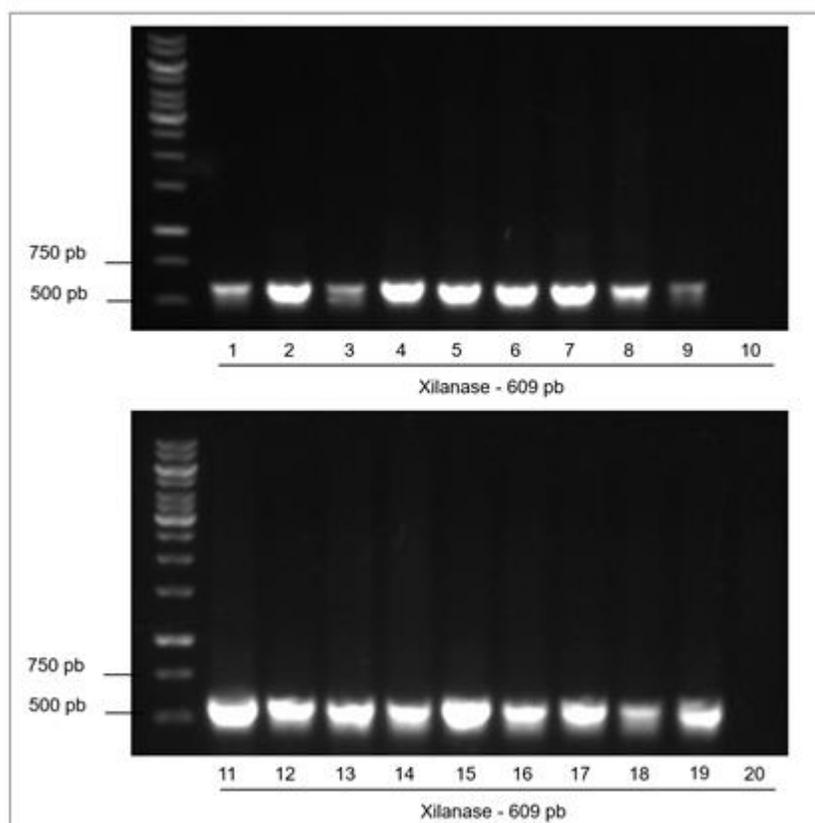


Figura 12 - PCR de colônia para confirmar as colônias recombinantes. Apenas as colônias 10 e 20 deram negativas, uma vez que não indicaram amplificação no tamanho esperado (609 pb). Fez-se uso do marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir deste resultado, escolheu-se a colônia 4 para seguir os experimentos. Desse modo, com a colônia recombinante definida foi feito um inóculo. Posteriormente, usando o inóculo realizado, fez-se reações de *miniprep*, a fim de obter o plasmídeo purificado para a reação de linearização. Salienta-se que esse fragmento clonado será também sequenciado para que se tenha certeza da ausência de mutações nesta etapa.

5.4.3 Reação de Linearização do plasmídeo (pPICZ α A + xilanase)

Com o plasmídeo purificado a partir da reação de *miniprep*, empregou-se a reação de linearização, a qual permitiu linearizar o vetor até então circular, a fim de possibilitar a recombinação homóloga na *Pichia pastoris*. Assim, por meio do uso do sítio de restrição *PmeI* linearizou-se a construção pPICZ α A + xilanase (Figura 13) na região 5' AOX1, o que possibilitará a integração da sequência de interesse na levedura sob ação do promotor AOX1. Desse modo, as regiões promotora e terminadora de AOX1, contidas no vetor, irão favorecer o pareamento do plasmídeo e da região de AOX1 no cromossomo da levedura na transformação.

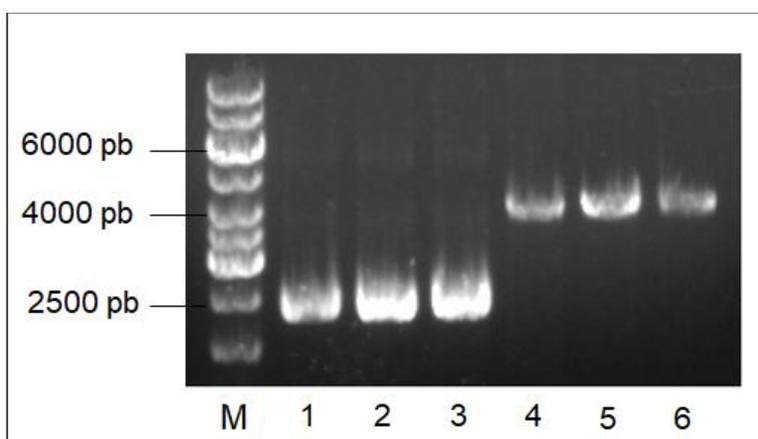


Figura 13 - Linearização da construção pPICZ α A + xilanase. A partir do sítio de restrição *PmeI*, pode-se linearizar o plasmídeo. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 1, 2 e 3- pPICZ α A + xilanase não clivado; 4, 5 e 6- pPICZ α A + xilanase clivado (4209 pb).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.4 Precipitação do DNA

Partindo do DNA linearizado, foi-se necessário realizar a precipitação da amostra a fim de purificá-la. Tal processo foi realizado por meio da técnica de *salting out*, que consiste na adição de um sal com alta força iônica, o acetato de sódio (CH₃COONa) em alta molaridade, o que ocasionou uma insolubilização do DNA e sua precipitação, uma vez que a água prefere solvatar os íons fortes do que a própria molécula. Isto, devido à diferença nas forças iônicas.

Por ser uma precipitação reversível, após a adição da água a amostra se solubilizou novamente e pode ser armazenada para a posterior transformação. Assim, verificou-se a precipitação a partir de um gel de agarose 1% (Figura 14).

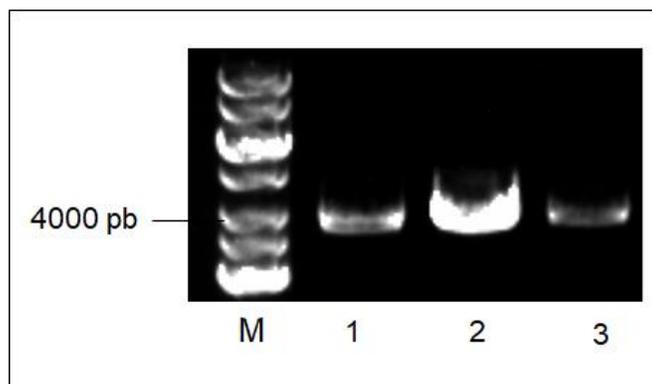


Figura 14 - Precipitação das amostras linearizadas. Visualização dos *amplicons* referentes à pPICZ α A + xilanase linearizado na altura correta, o que comprovou que a precipitação foi feita satisfatoriamente. M- Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 1, 2 e 3- pPICZ α A + xilanase linearizado e purificado pela técnica de precipitação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 PERSPECTIVAS

Neste sentido, destaca-se que o trabalho continuará com as etapas de expressão e análise de atividade enzimática. Assim, a partir de trabalhos futuros – como no mestrado, o qual tenho interesse –, a enzima será amplamente caracterizada.

Além disso, venho desenvolvendo, com o grupo de pesquisa, trabalhos com outras enzimas capazes de degradar outras porções da fibra lignocelulósica. Tais enzimas são de grande interesse industrial e possuem aplicações que vão muito além da produção de biocombustíveis.

6.1 Expressão em *Pichia pastoris*

A partir desses dados, irão ter início os ensaios que terão como objetivo final a expressão heteróloga da enzima na linhagem KM71H de *Pichia pastoris*. Desse modo, primeiro serão preparados o pré-inóculo de células da linhagem KM71H, as células eletrocompetentes e, em seguida, será realizada a transformação na levedura.

A expressão heteróloga terá como base o uso da *P. pastoris*, que é uma levedura metilotrófica, capaz de realizar modificações pós-traducionais na proteína, que são extremamente necessárias para o desempenho de sua atividade enzimática. Desse modo, a partir da construção pPICZ α A + xilanase linearizada e purificada será utilizada a técnica de eletroporação em células competentes a 1,5 KV, 25 μ F e 200 Ω . Neste sentido, destaca-se a presença de uma extremidade coesiva, produzida na linearização do plasmídeo, a qual permitirá o mecanismo de recombinação homóloga da levedura, levando à substituição do gene AOX1 no cromossomo, pelo fragmento xilanase (Figura 15). Isto, pois, o plasmídeo não é compatível com a replicação em *P. pastoris*, um organismo eucarioto, e é degradado ou perdido na geração seguinte.

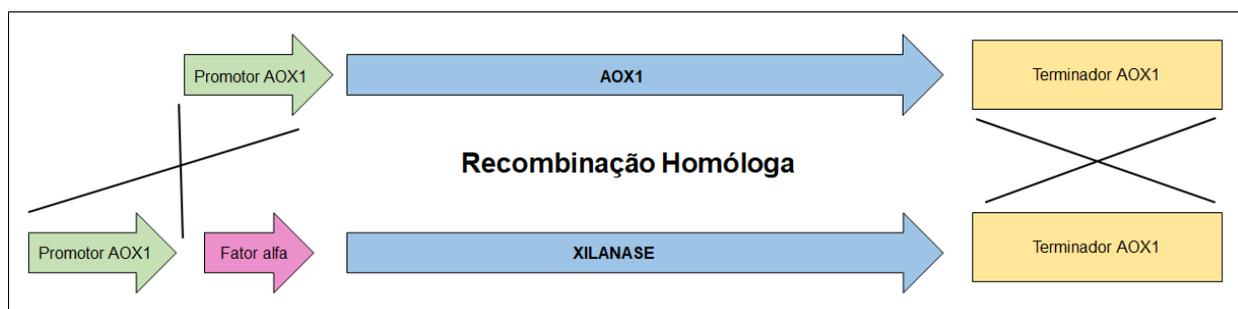


Figura 15 - Esquema representando a recombinação homóloga no genoma das células da levedura *Pichia pastoris*. As regiões promotora e terminadora de AOX1, presentes no vetor, possibilitam o pareamento na região de AOX1 no cromossomo da levedura. A presença de uma extremidade coesiva, gerada na linearização do plasmídeo, dá início ao mecanismo de recombinação homóloga na levedura, levando à substituição do gene no cromossomo pelo fragmento correspondente à xilanase.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, para avaliar as leveduras transformadas, diferentes concentrações de zeocina (100 μ g/ μ L, 250 μ g/ μ L e 500 μ g/ μ L) serão empregadas, a fim de selecionar os clones que serão usados na produção da xilanase. Isto, pois colônias que crescem em maiores quantidades de zeocina, apresentam maiores concentrações de DNA. Após o *screening* das leveduras, terá início a etapa de expressão nas cepas selecionadas. Posterior ao cultivo das leveduras transformadas, irá se avaliar a produção da proteína recombinante após 24, 48 ou 72 horas de indução com metanol e em diferentes temperaturas. Assim, o sobrenadante o qual apresenta a proteína secretada será analisado por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie e Western Blot - utilizando o anticorpo anti-His. Salienta-se que tais técnicas mencionadas permitem uma

análise da presença da proteína exógena a partir da visualização de uma banda na altura correspondente à sua unidade de massa atômica (KDa). De maneira simplificada, destaca-se que o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizará uma separação das proteínas com base em seus pesos moleculares e o Western Blot fará uso de anticorpos os quais serão capazes de identificar a proteína por meio do reconhecimento de epítomos.

A partir da visualização da presença da proteína de interesse, terão início as etapas de purificação que envolvem o uso da técnica de cromatografia por afinidade por meio de coluna de níquel, que apresenta afinidade pela cauda de histidina (His-Tag) presente na proteína. As eluições serão feitas com imidazol e, para essa etapa, será realizado um gradiente o qual terá como objetivo determinar a concentração ideal de imidazol para eluição da proteína. Assim, a verificação de pureza da xilanase será feita por eletroforese em gel SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 15% e por atividade enzimática.

6.2 Testes de atividade enzimática

Dessa maneira, os testes de atividade serão realizados a partir de experimentos bioquímicos e sempre comparados a controles em ágar contendo o substrato da enzima - a xilana - segundo descrito por Cayetano-Cruz *et al.* (2016), com adaptações.

7 CONCLUSÃO

Até o momento, pelos resultados apresentados, fica claro que o objetivo central do trabalho que era a clonagem e expressão heteróloga de uma xilanase da espécie *Heterotermes tenuis* para possível uso na produção de biocombustíveis foi parcialmente alcançado. Isto, pois existiram empecilhos, por conta do período de pandemia, que dificultaram as etapas práticas de expressão e obtenção da enzima recombinante.

Contudo, o estudo apresenta grande potencial na apresentação de uma enzima que apresenta características interessantes para a indústria de produção de etanol de segunda geração. À medida que o fragmento codificante da xilanase foi isolado e clonado eficientemente nos vetores de clonagem e expressão, indicando ótimos resultados até

então. Além disso, por conta dos hábitos noturnos do cupim - baixa temperatura de forrageio -, espera-se encontrar uma enzima com novas características de atividade em temperatura e pH diferente dos comercialmente conhecidos. Tais novidades muito auxiliarão no processo produtivo, por conta, principalmente, da economia energética que será proporcionada aos produtores de etanol de segunda geração com as variações de temperaturas necessárias entre a fase de hidrólise e de fermentação.

Assim, contribui-se para a utilização sustentável dos subprodutos advindos da cana-de-açúcar, os quais são materiais baratos, abundantes e renováveis, com grandes vantagens de utilização. Desse modo, unido ao potencial brasileiro, pode-se sugerir novas alternativas para os processos até então conhecidos e utilizados na produção deste biocombustível tão importante. Auxiliando, assim, no cumprimento dos objetivos e propostas realizados nas políticas públicas e nos acordos internacionais dos quais o Brasil é signatário.

Além disso, mesmo no período de pandemia, participei de um artigo recém aprovado na revista *Insect Molecular Biology*, intitulado “Expression profiles of neotropical termites reveal microbiota-associated, caste-biased genes and biotechnological targets”. Tal artigo trata da análise de 3 espécies de cupins neotropicais: *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae), *Velocitermes heteropterus* (Isoptera: Termitidae) e *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae), das diferentes expressões genéticas em cada uma das espécies e das castas operário e soldado. Ademais, faz-se uma relação com a presença de microrganismos endossimbióticos, os quais auxiliam na digestão do material lignocelulósico e no metabolismo de nitrogênio nos cupins, nas diferentes famílias. Assim, observou-se diferenças na microbiota associada a cada família de cupins e encontrou-se genes de protistas em ambas as espécies de Termitidae, fato este que é oposto ao encontrado na literatura. Dentre os genes diferencialmente expressos destacou-se, no artigo, apenas aqueles que estão envolvidos na diferenciação de castas e na digestão da celulose, os quais são potenciais para a realização de outros estudos relacionados ao controle de cupins, à digestão de biomassa e de diversas outras aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. “**Lei 13.576 - 2017**”. 2017. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-federal/leis/2017&item=lei-13.576--2017>. Acesso em: 6 ago. 2020.

AGUIAR, C. M., LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, 2011.

ALOKIKA, SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8763–8784, 2019.

ARAKAWA, G. *et al.* Purification and Molecular Cloning of Xylanases from the Wood-Feeding Termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 710-718, 2009.

BARON, M. *et al.* A Selectable Bifunctional b-Galactosidase: Phleomycin-resistance Fusion Protein as a Potential Marker for Eukaryotic Cells. **Gene**, v. 114, n. 2, p. 239-243, 1992.

CAMPANINI, E. B. *et al.* Expression profiles of neotropical termites reveal microbiota-associated, caste-biased genes and biotechnological targets. **Insect Molecular Biology**, <https://doi.org/10.1111/imb.12684>, 2020.

CASARIN, F., COSTA-LEONARDO, A., ARAB, A. Soldiers initiate foraging activities in the subterranean termite, *Heterotermes tenuis*. **Journal of Insect Science**, v. 8:02, n.1, 2008.

CAYETANO-CRUZ, M. *et al.* High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. **Biochemical engineering journal**, v. 112, p. 161-169, 2016.

CAZY. “**Glycoside Hydrolase Family 11**”. 2021. Disponível em: <http://www.cazy.org/GH10.html>. Acesso em: 12 jan. 2021a.

CAZY. “**Glycoside Hydrolase Family 11**”. 2021. Disponível em: <http://www.cazy.org/GH11.html>. Acesso em: 12 jan. 2021b.

CEISE. “**RenovaBio: menor emissão de CO₂ do etanol 2G aumentará a liderança da cana, etanol de milho dos EUA dobra a emissão**”. 2018. Disponível em: <http://www.ceisebr.com/conteudo/renovabio-menor-emissao-de-co2-do-etanol-2g-aumentara-a-lideranca-da-cana-etanol-de-milho-dos-eua-dobra-a-emissao.html>. Acesso em: 12 jan. 2021.

CHANDEL, A. K. *et al.* Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8-20, 2011.

COSTA-LEONARDO, A.M. Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Ana Maria Costa-Leonardo, Rio Claro, 2002.

DHEERAN, P. *et al.* A novel thermostable xylanase of *Paenibacillus macerans* IIPSP3 isolated from the termite gut. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 851-860, 2012.

DROCOURT, D. *et al.* Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble Gene for Transformation of Lower and Higher Eukaryotes to Phleomycin Resistance. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 13, p. 4009, 1990.

ELEOTÉRIO, E. S. R. Levantamento e identificação de cupins (Insecta: Isoptera) em área urbana de Piracicaba – SP. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 1, p. 125-139, 2000.

GUPTA, S., BHUSHAN, B., HOONDAL, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft Pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 325-334, 2000.

HAGHIGHI MOOD, S. *et al.* Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

HARRIS, A. D., RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, p. 1-11, 2010.

HOWARD *et al.* Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

KOBS, G. Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM®-T Vector Systems. **Promega Notes**, v. 62, p. 15–18, 1997.

KOUTZ, P. J. *et al.* Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. **Yeast**, v. 5, n. 3, p. 167-177, 1989.

KUMAR, S. *et al.* Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-20, 2017.

KUMAR, V., DANGI, A. K., SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Mol Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226-235, 2018.

LIMA, J. T., COSTA-LEONARDO, A. M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 243-250, 2007.

MAALEJ-ACHOURI, I. *et al.* The effect of *Talaromyces thermophilus* cellulase-free xylanase and commercial laccase on lignocellulosic components during the bleaching of kraft pulp. **Int Biodeterior Biodegrad**, v. 75, p. 43-48, 2012.

MACHARIA, R. W., OMBURA, F. L., AROKO, E. O. Insects' RNA profiling reveals absence of "hidden break" in 28S ribosomal RNA molecule of onion thrips, *Thrips tabaci*. **Journal of nucleic acids**, p. 1-8, 2015.

MANRICH, A. Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas. 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

MIRANDA, C. S., VASCONCELLOS, A., BANDEIRA, A. G. Cupins em cana-de-açúcar no nordeste brasileiro: aspectos ecológicos e seu potencial como praga. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 237-241, 2004.

NI, J., TOKUDA, G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 838-850, 2013.

PEDRINO, M. G. **Cupins como modelo biotecnológico: do transcriptoma de operários e soldados de *Heterotermes tenuis* à expressão da α -amilase** (Monografia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração? **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

PÉREZ, J. *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n 2, p. 53-63, 2002.

PIERRO, B. “**Iniciativa sugere fortalecer o setor de bioenergia após a pandemia**”. 2020. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/iniciativa-sugere-fortalecer-o-setor-de-bioenergia-apos-a-pandemia/#SITE_Biofuturo. Acesso em: 16 out. 2020.

RABONATO, A. C. Linhagens Fúngicas na Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar. Tese (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013.

RESENDE, A. S. *et al.* Efeito estuda e o sequestro de carbono em sistemas de cultivo com espécies florestais e na cultura de cana-de-açúcar. **Embrapa Agrobiologia**, n. 133, 2001.

ROBLES, J., DOERS, M. pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. **Promega Notes**, v. 45, p. 19–20, 1994.

WINNEBECK, E. C. *et al.* Why does insect RNA look degraded?. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 159, p. 1-7, 2010.

YANG, S. *et al.* Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp: a review. **Bioresour Technol**, v. 228, p. 440-448, 2019.