



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - CBIOTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães

PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS) VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) EM DIFERENTES SUBSTRATOS

João Pessoa – Paraíba – Brasil

Novembro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - CBIOTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães

**PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *BEAUVERIA*
BASSIANA (BALS) VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) EM
DIFERENTES SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada à banca
examinadora do Centro de Biotecnologia
da Universidade Federal da Paraíba para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Farias de Almeida

João Pessoa – Paraíba – Brasil

Novembro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

G963p Guimarães, Ana Gabriella Lucena de Paiva.
 Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria Bassiana* (BALS) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos / Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães.- João Pessoa, 2016.
 117f. : il.
 Orientadora: Adna Cristina Barbosa de Sousa
 Coorientadora: Andréa Farias de Almeida
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB
 1. Biotecnologia. 2. Controle biológico. 3. Substratos naturais. 4. Fungos filamentosos. 5. Enzimas extracelulares. 6. Fermentação.

UFPB/BC

CDU: 60(043)

João Pessoa, 25 de Novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa Adna Cristina Barbosa de Sousa

Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo Santos Sharline Santos

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral Ian Amaral

Membros Suplentes

Prof^ª. Dr^ª. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente _____

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz _____

Você diz “estou exausto”. Mas assim diz a palavra do Senhor: “*mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam*”. (Isaias 40:31)

A **DEUS** que guiou meus
caminhos me proporcionando sabedoria e disposição
para enfrentar todas as etapas dessa árdua caminhada.

Ao meu amado esposo **ANDRÉ PHILIPPE
DE BRITO PEREIRA GUIMARÃES** e aos meus

queridos pais,
**JOSÉ LUCIANO PESSOA DE PAIVA e
GISELLE LUCENA DE PAIVA**

que me incentivaram a dar
este grande passo.

Amo vocês!

Com gratidão, satisfação e afeto

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS**, autor da minha vida, que me concedeu graça, força e sabedoria para realização e conclusão desse trabalho.

À minha **FAMÍLIA**, por todo o apoio, incentivo e compreensão.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA** pela oportunidade oferecida na realização do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, me proporcionando os alicerces necessários para o meu crescimento profissional.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA** pelo carinho, amizade, sabedoria e postura profissional. Pelo imenso aprendizado, pela paciência e rigor com meus erros, por tantos ensinamentos, pela compreensão, dedicação, sugestões e incentivos fundamentais para realização deste trabalho.

À minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. ANDRÉA FARIAS DE ALMEIDA** pelos ensinamentos, atenção e contribuição com o trabalho, pela persistência, competência, mas principalmente pelo imenso carinho e grandiosos momentos compartilhados juntos. Sua co-orientação foi de extrema importância, me servindo de aprendizado durante todo esse período.

Aos meus queridos pais, **JOSÉ LUCIANO P. DE PAIVA** e **GISELLE LUCENA DE PAIVA**, por todo amor, dedicação e apoio ao longo de minha caminhada. Por sempre acreditaram em mim e me encorajaram a seguir em frente.

Ao meu esposo, **ANDRÉ PHILIPPE DE B. P. GUIMARÃES** pelo carinho, amor, paciência e por me encorajar nos momentos difíceis, sempre acreditar em mim e não me deixar desistir.

Aos meus amados irmãos, **JOSÉ LUCIANO P. DE P. FILHO** e **JOÃO LUCAS L. DE PAIVA**, pelos momentos de alegria, brincadeiras, confiança e aprendizados que passamos juntos em nossas vidas, criando laços fraternais que durarão eternamente.

Aos Membros da Pré-banca **Prof. Dr. IAN PORTO G. DO AMARAL** e **Prof. Dr. VALDIR DE A. BRAGA** pelas valiosas sugestões e inestimáveis contribuições durante a avaliação desse trabalho, sempre estimulando o meu potencial.

Aos **MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA** por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho.

Aos amigos e demais colegas de curso pelo apoio, amizade sincera, cumplicidade e troca de experiência durante a realização dos experimentos, que foram fundamentais para que eu conseguisse seguir em frente a cada obstáculo.

À **Prof^a. Dr^a. SHARLINE FLORENTINO DE M. SANTOS** pela disponibilidade do seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. KRISTERSON REINALDO DE LUNA FREIRE** por contribuir com o trabalho nos fornecendo resíduos de sua Cervejaria Artesanal.

Aos **PROFESSORES** e **PESQUISADORES**, que em conversas informais ao longo destes dois anos, contribuíram com ideias e opiniões que estarão presentes ao longo de toda a minha vida.

À secretaria **TÂNIA MARIA A. DE ARAÚJO** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFPB pela cordial atenção e boa vontade em me atender em todos os momentos que precisei.

Ao **DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA** (Micoteca URM) da Universidade Federal de Pernambuco pela doação da linhagem fúngica.

Enfim, a todos aqueles que sonham em dar o melhor de si para ver a ciência atingir a sua essência. Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
PRÓLOGO	1
INTRODUÇÃO	3
OBJETIVOS	5
REVISÃO DE LITERATURA	6
ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	6
IMPORTÂNCIA DO CONTROLE BIOLÓGICO.....	8
CUPIM DO COQUEIRO.....	11
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA CULTIVO DE FUNGOS.....	13
Arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	13
Algaroba (<i>Prosopis juliflora</i> (sw) d. C.).....	15
Bagaço da cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.).....	16
Resíduo de cervejaria - malte.....	18
Fibras e sementes de acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.).....	20
ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR FUNGOS.....	21
Enzimas proteolíticas.....	21
Enzimas amilolíticas.....	22
Enzimas celulolíticas.....	24
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	26
Fermentação estado sólido - (FES).....	26
EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
IMPORTÂNCIA E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA.....	28
CAPÍTULO I	
Produção e viabilidade dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos brutos.....	31
CAPÍTULO II	
Produção e atividade das enzimas hidrolíticas em diferentes substratos por fermentação em estado sólido.....	54
CONCLUSÕES GERAIS	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	91

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA	PÁGINA
Figura 01: Colônia de <i>Beauveria bassiana</i> (A). Células conidiogênicas de <i>Beauveria bassiana</i> (B).....	7
Figura 02: Cupinzeiro no tronco do coqueiro (A). Cupins no interior do ninho (B).....	12
Figura 03: Cultura do arroz (A). Grão do arroz (B).....	14
Figura 04: Cultura da algaroba (A). Vagem (B). Vagem da algaroba processada para cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> (C).....	16
Figura 05: Cultura da cana-de-açúcar (A). Bagaço da cana-de-açúcar (B).....	18
Figura 06: Resíduo de malte.....	19
Figura 07: Cultura da acerola (A) Fibra de acerola - descarte industrial (B). Semente de acerola - descarte industrial (C).....	20
Figura 08: Estrutura química do amido.....	23
Figura 09: Estrutura química da celulose.....	25
CAPÍTULO I	
Figura 01: Aspecto macroscópico da colonização de <i>Beauveria bassiana</i> na fibra de algaroba (A), malte A (B), malte B (C), fibra de acerola (D) e bagaço de cana-de-açúcar (E) após dez dias de crescimento.....	39
Figura 02: Comportamento de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos em diferentes substratos quanto à viabilidade dos conídios: A) bagaço da cana-de-açúcar; B) arroz polido; C) malte B; D) fibra da acerola; E) fibra da algaroba.....	44
Figura 03: Infecção do cupim com <i>Beauveria bassiana</i> . Bioensaio realizado em água destilada autoclavada. Mumificação do inseto após 120 horas de infecção. Conídios produzidos na fibra de algaroba (A), malte A (B), malte B (C), semente de acerola (D) e bagaço de cana-de-açúcar (E). Controle negativo – após 120 horas (F).....	46
CAPÍTULO II	
Figura 01: Substratos antes e depois da fermentação em estado sólido através da colonização de <i>Beauveria bassiana</i> malte B (A e B), malte A (C e D), semente de acerola (D e E), bagaço de cana-de-açúcar (F e G) e fibra de algaroba (H e I).....	68
Figura 02: Atividade amilolítica do cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes substratos.....	70
Figura 03: Análise da temperatura ótima das enzimas amilolíticas produzidas nos substratos de resíduo de malte A, resíduo de malte B, fibra de algaroba e semente de acerola.....	72
Figura 04: Análise da temperatura ótima para as enzimas amilolíticas produzidas a partir do substrato resíduo de malte B.....	74
Figura 05: Análise da termoestabilidade no substrato malte A.....	75
Figura 06: Análise da termoestabilidade no substrato malte B.....	76
Figura 07: Análise da termoestabilidade no substrato fibra de algaroba.....	77
Figura 08: Análise da termoestabilidade no substrato semente de acerola.....	77

Figura 09: Atividade celulolítica endoglucanase (CMcase) do cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes substratos.....	79
Figura 10: Atividade celulolítica exoglucanase (FPase) do cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes substratos.....	80
Figura 11: Atividade proteolítica do cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes substratos.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	PÁGINA
Tabela 01: Origem da linhagem de <i>Beauveria bassiana</i>	35
Tabela 02: Origens dos substratos.....	35
Tabela 03: Variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> após 10 dias de incubação ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$).....	42
Tabela 04: Produção média e viabilidade de conídios (conídios/g) em diferentes substratos de <i>Beauveria bassiana</i> ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$).....	44
Tabela 05: Atividade patogênica de <i>Beauveria bassiana</i> produzido em diferentes substratos sobre o cupim adulto do coqueiro em condições de laboratório na concentração de 10^6 conídios ml^{-1} . Período de incubação - 10 dias.....	48
CAPÍTULO II	
Tabela 01: Origem da linhagem de <i>Beauveria bassiana</i>	58
Tabela 02: Origens dos substratos.....	58
Tabela 03: Caracterização dos substratos.....	65
Tabela 04: Valores de pH antes e após 240 horas do cultivo.....	69
Tabela 05: Quantidade de proteína total encontrada nos substratos antes e após 10 dias de cultivo da <i>Beauveria bassiana</i>	83

Paiva-Guimarães, Ana Gabriella Lucena de. Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos. 2016. 117p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Pós-graduação – Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – PB.

RESUMO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico usado no controle biológico de insetos-praga na agropecuária. Os custos de produção de seus conídios, em larga escala, no substrato padrão (arroz) utilizado atualmente onera o processo de produção. Encontrar alternativas como forma de minimizar os custos do processo, levou a necessidade de averiguar a eficiência de substratos alternativos que, além de propriedades nutricionais importantes, possuem grande disponibilidade e baixo custo. Os fungos entomopatogênicos produzem enzimas que estão envolvidas no processo de patogenicidade e virulência. Porém, ao serem estimulados por substratos específicos podem produzir enzimas de interesse biotecnológico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de diferentes substratos (fibra da algaroba, resíduos de malte, sementes e fibras de acerola e bagaço da cana-de-açúcar) para conidiogênese e produção enzimática (fermentação em estado sólido) a partir de *B. bassiana*. Os experimentos para produção e viabilidade dos conídios foram realizados em triplicata, em *erlernmeyer* (250 mL) contendo 30 g de cada substrato, 0,3 µL da suspensão de conídios (1×10^6 conídios/mL), umidade de $70 \pm 10\%$ e temperatura ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Após 10 dias de incubação, os substratos arroz (meio padrão) ($2,00 \times 10^6$ conídios/g de substrato), malte A ($1,22 \times 10^6$ conídios/g), malte B ($1,75 \times 10^6$ conídios/g) e fibra de algaroba ($2,36 \times 10^6$ conídios/g), proporcionaram maior produção de conídios. A viabilidade dos conídios produzidos nesses mesmos substratos não diferiu estatisticamente entre si, com porcentagem de germinação de 99,96; 90,04; 93,17 e 98,21 %, respectivamente. A patogenicidade dos conídios de *B. bassiana* produzidos nos diferentes substratos foi avaliada no cupim do coqueiro. A taxa de mortalidade dos cupins infectados não diferiu estatisticamente superando 80 % de mortalidade com exceção do grupo controle. A atividade enzimática (celulolítica, amilolítica) foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico). Os substratos utilizados na fermentação em estado sólido, malte A ($1,178 \pm 0,002$ U/mL), malte B ($2,392 \pm 0,013$ U/mL), fibra algaroba ($0,596 \pm 0,007$ U/mL) e semente de acerola ($0,964 \pm 0,09$ U/mL) apresentaram atividade amilolítica. A partir dessa análise, diferentes temperaturas foram avaliadas (30° , 40° , 50° , 60° , 65° e 70°C) para identificar a temperatura ótima das enzimas amilolíticas produzidas nesse processo. Observou-se que as maiores atividades encontradas foram em temperaturas extremas, na faixa de 60° a 70°C , sugerindo que essas enzimas são termofílicas. O bagaço de cana de açúcar apresentou maior atividade celulolítica ($15,29 \pm 0,07$ U/mL) para CMcase e ($2,58 \pm 0,9$ U/mL) para FPase devido à característica de sua matriz celulósica, que difere dos demais substratos. A atividade proteolítica foi quantificada utilizando a azocaseína. A algaroba apresentou a maior atividade ($0,514 \pm 0,009$ U/mL). Os substratos alternativos utilizados para crescimento e esporulação de *B. bassiana* podem fornecer uma redução de aproximadamente 50 % nos custos de produção de conídios de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de vários insetos-praga.

Além disso, apresentam-se como alternativa viável para a produção de enzimas microbianas com aplicação ampla em diversos processos biotecnológicos.

Palavras chave: Controle biológico, substratos naturais, fungos filamentosos, enzimas extracelulares, fermentação

Paiva-Guimarães, Ana Gabriella Lucena de. Conidia production and hydrolytic enzymes by *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on different substrates. 2016. 117p. Dissertation (Master of Biotechnology) - Graduate School - Federal University of Paraíba - UFPB - João Pessoa - PB.

ABSTRACT

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus used in the biological control of insect pests in agriculture. The production costs of its conidia, on a large scale, in the standard substrate (rice) currently used, affects the production process. Finding alternatives as a way of minimizing process costs has led to the need to investigate the efficiency of alternative substrates that, in addition to important nutritional properties, have high availability and low cost. Entomopathogenic fungi produce enzymes that are involved in the process of pathogenicity and virulence. However, when stimulated by specific substrates they can produce enzymes of biotechnological interest. Thus, the objective of this work was to analyze the potential of different substrates (algaroba fiber, malt residues, acerola seeds and fibers, and sugarcane bagasse) for conidiogenesis and enzymatic production (solid state fermentation) from of *B. bassiana*. The experiments for the production and viability of the conidia were carried out in triplicate, in erlenmeyer (250 mL) containing 30 g of each substrate, 0.3 μ L of the conidial suspension (1×10^6 conidia/mL), humidity of 70 ± 10 % and Temperature ($T = 29 \pm 1$ ° C). After 10 days of incubation, the rice substrates (standard medium) (2.00×10^6 conidia/g substrate), malt A (1.22×10^6 conidia/g), malt B (1.75×10^6 conidia/g), and algaroba fiber (2.36×10^6 conidia/g) provided higher conidia production. The viability of the conidia produced in these same substrates did not differ statistically among them, with a germination percentage of 99.96; 90.04; 93.17 and 98.21 %, respectively. The pathogenicity of the *B. bassiana* conidia produced on the different substrates was evaluated in the coconut termite. The mortality rate of infected termites did not differ statistically, surpassing 80 % mortality, except for the control group. The enzymatic activity (cellulolytic and amylolytic) was determined by the DNS method (dinitrosalicylic acid). The substrates used in the solid state fermentation, malt A (1.178 ± 0.002 U/mL), malt B (2.392 ± 0.013 U/mL), algaroba fiber (0.596 ± 0.007 U/mL) and acerola seed (0.964 ± 0.09 U/mL) showed amylolytic activity. From this analysis, different temperatures (30°, 40°, 50°, 60°, 65°, and 70° C) were evaluated to identify the optimum temperature of the amylolytic enzymes produced in this process. It was observed that the greatest activities found were in extreme temperatures, in the range of 60° to 70° C, suggesting that these enzymes are thermophilic. Sugarcane bagasse presented higher cellulolytic activity (15.29 ± 0.07 U/mL) for CMcase and (2.58 ± 0.9 U/mL U/mL) for FPase due to the characteristic of its cellulosic matrix, which differs from the other substrates. Proteolytic activity was quantified using azocasein. The algaroba had the highest activity (0.514 ± 0.009 U / mL). The alternative substrates used for growth and sporulation of *B. bassiana* can provide a reduction of approximately 50 % in the cost of producing conidia of entomopathogenic fungi used in the biological control of several insect pests. In addition, they are presented as a viable alternative for the production of microbial enzymes with wide application in several biotechnological processes.

Key words: Biological control, natural substrates, filamentous fungi, extracellular enzymes, fermentation.

PRÓLOGO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatôgeno mundialmente conhecido por sua utilização no controle biológico de insetos-praga, por apresentar especificidade a várias espécies de insetos e ser de fácil produção *in vitro*. Atualmente, *B.bassiana* é comercializado no arroz devido ao balanço nutricional, ampla disponibilidade mundial, características físicas (tamanho e forma dos grãos), propriedades de hidratação e integridade estrutural mesmo após a colonização pelo fungo. Entretanto, o elevado preço do arroz tem acarretado despesas crescentes aos produtores de conídios. Com o intuito de baratear esse método de controle, minimizando os custos da produção em grande escala, substratos alternativos e resíduos agroindustriais que apresentam fontes ricas em nutrientes e possuem grande potencial, tem sido utilizado para o cultivo desse fungo. Portanto, além de baratear o processo de conidiogênese, ao expor o fungo a esses substratos não convencionais o micro-organismo pode produzir enzimas hidrolíticas de interesse industrial com ampla aplicação.

Considerando a importância do controle biológico, a utilização e o reaproveitamento de substratos alternativos e resíduos agroindustriais, este trabalho apresenta a utilização de resíduos e substratos não convencionais brutos (fibra da algaroba, resíduos de malte, sementes e fibras de acerola e bagaço da cana-de-açúcar), sem adição de nenhum suplemento nutricional para produção de conídios de *B.bassiana* visando à utilização dos mesmos no controle biológico de insetos-praga em substituição aos agrotóxicos. Além disso, apresenta a utilização desses mesmos substratos para averiguar a atividade e termoestabilidade das enzimas proteolíticas, amilolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido.

Os resultados obtidos durante esse trabalho de Mestrado estão apresentados neste manuscrito no formato de artigos, num total de dois (capítulos 1 e 2). O primeiro artigo intitulado

“Produção e viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos brutos”, será submetido à Revista *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, refere-se à conidiogênese e à viabilidade dos conídios de *B. bassiana* produzido nos substratos arroz polido (meio padrão), malte A, malte B, fibra da algaroba, sementes e fibra da acerola. Sendo a viabilidade dos conídios comprovada pelo teste de patogenicidade no cupim do coqueiro.

O segundo artigo “Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em diferentes substratos através da fermentação em estado sólido”, será submetido à Revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Esse artigo teve como objetivo verificar o potencial de produção e estabilidade térmica das enzimas hidrolíticas obtidas por *B. bassiana* em diferentes substratos (malte, fibra da algaroba, sementes da acerola) através da fermentação em estado sólido.

Espera-se que os resultados aqui mostrados, possam contribuir para o avanço do controle biológico maximizando a produção dos conídios e reduzindo os custos. Bem como, a utilização desses diferentes substratos em processos fermentativos para produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Ana Gabriella L.de P.Guimarães

INTRODUÇÃO

O controle de pragas em sua maioria tem sido realizado por meio de agrotóxicos, gerando problemas de intoxicação humana e da fauna silvestre, resíduos nos alimentos, na água e no solo, aparecimento de novas pragas e de populações resistentes a esses produtos (ALVES et al., 2008a).

Em busca de técnicas e soluções ecologicamente corretas, devido em grande parte à conscientização em relação ao mau uso de agrotóxicos, o controle biológico de pragas por intermédio de agentes microbianos é considerado promissor. Dentre os agentes de controle microbiano de pragas de importância econômica destacam-se os fungos, devido à abundância de gêneros e espécies (ZIMMERMANN, 1982; ALVES, 1986b e 1992).

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* se destaca como um importante agente no controle de pragas. É comumente encontrada parasitando insetos, ocorrendo em mais de 200 espécies (ALVES, 1998). Este fungo tornou-se conhecido internacionalmente pela produção e comercialização de uma formulação concentrada de conídios, usada no controle de pragas (ALVES, 1998a).

Um dos principais fatores para o sucesso do controle biológico utilizando *B. bassiana* é a produção de grande quantidade de conídios por um preço competitivo. Assim, o processo de produção deve ser barato e ao mesmo tempo produzir conídios viáveis e virulentos (ROBL et al., 2009).

Visando à redução de custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, substratos naturais, tais como painço, quirela de milho, trigo em grão (EL DAMIR, 2006), farinha de tapioca, batata doce, extratos de abóbora e de mamão (IBRAHIM; LOW, 1993),

mistura de farelo e casca de arroz, cevada (DORTA et al., 1990; NELSON et al., 1996), entre outros, vêm sendo utilizados, apresentando resultados promissores para produção de *B. bassiana*.

B. bassiana produz exoenzimas que estão envolvidas no processo de penetração do tegumento do hospedeiro. Em decorrência desta produção enzimática inerente ao processo de infecção do fungo em relação ao inseto-praga, ao expor o fungo a substratos não convencionais, estimula e promove a produção de enzimas de interesse industrial (BIDOCHKA; KACHATOURIANS, 1990; VALADARES-INGLIS; AZEVEDO, 1997).

A utilização de substratos não convencionais trará novas perspectivas para o estudo da produção de *B. bassiana* e das características enzimáticas oriundas desse processo, promovendo avanços em direção aos estudos do controle biológico de pragas, avaliação do crescimento em substratos alternativos, viabilidade dos conídios, patogenicidade, produção de enzimas (amilolíticas, proteolíticas e celulolíticas), e estabilidade térmica dessas enzimas visando sua comercialização e aplicação na indústria. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial de utilização de diferentes substratos para conidiogênese e em processos fermentativos (estado sólido) para produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

OJETIVOS

GERAL

- Analisar o potencial de utilização de diferentes substratos para conidiogênese e em processos fermentativos (estado sólido) para produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento e a esporulação (conidiogênese) de *B. bassiana* em meio de cultura a base de arroz, fibra da algaroba, resíduos de malte (malte A e malte B), sementes e fibra de acerola e bagaço da cana-de-açúcar;
- Avaliar a viabilidade dos conídios produzidos em diferentes substratos;
- Analisar a capacidade bioinseticida e o processo de infecção de *B. bassiana* sobre o cupim do coqueiro;
- Avaliar o potencial de produção enzimática (amilases, celulasas e proteases) através dos processos fermentativos (estado sólido) utilizando os substratos: fibra da algaroba, resíduos de malte (malte A e malte B), sementes de acerola e bagaço de cana-de-açúcar;
- Analisar a atividade enzimática no melhor substrato para produção enzimática em cultivo em estado sólido;
- Caracterizar as enzimas hidrolíticas produzidas em cultivo estado sólido.

REVISÃO DE LITERATURA

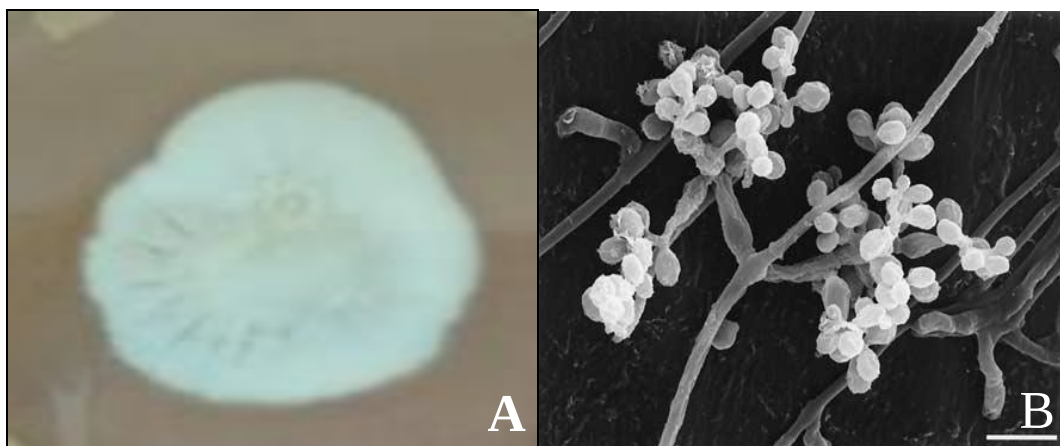
ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *BEAUVERIA BASSIANA*

Beauveria (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) é um gênero cosmopolita. Foi descrito em 1912 por Vuillemin e, através de análises bioquímicas e caracteres morfológicos, seis espécies foram identificadas: *B. Alba*, *B. amorph*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata*, *B. vermiconia* (MUGNAI et al., 1989). É classificado como um Deuteromiceto, Ordem Moniliales e Família Moniliaceae (MUGNAI; BRIDGE; EVANS, 1989). Esse fungo não apresenta a fase sexuada. Segundo Burdon (1993) fungos que se reproduzem de forma assexuada são geralmente menos diversos que os micro-organismos que possuem reprodução sexual, devido à ausência de recombinação genética. Apesar de se reproduzirem por via assexuada, *B. bassiana* apresenta considerável variabilidade genética, devido a sua ubiquidade, ampla distribuição geográfica e especificidade a diversos hospedeiros. Esta diversidade pode conferir ao micro-organismo uma plasticidade para se adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos. É considerado um parasita facultativo, pois apresenta durante o seu ciclo biológico uma fase parasitária e outra não parasitária (KUMAR et al., 1999).

É uma espécie de ocorrência generalizada em todos os países, sendo mais frequente sobre insetos e em amostras de solo, onde pode resistir por longo tempo em saprogênese (ALVES, 1998). Em condições de laboratório, pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que, em campo, ocorre de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros e em ocorrências enzoóticas sobre dípteros, himenópteros e ortópteros. *B. bassiana* infecta mais de 300 espécies de artrópodes, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (ALVES, 1998a).

A espécie *B.bassiana* (**Figura 1B**) caracteriza-se por apresentar conídios globosos ou subglobosos que variam de 2 a 3 μm de comprimento, hialinos e de formato esférico a ovóide (ALVES, 1998). Os conidióforos podem ser únicos ou agrupados irregularmente, de estrutura dilatada na base e fina na extremidade de onde saem os conídios (BARNETT, 1958). A colônia de *B.bassiana* apresenta uma morfologia de característica pulverulenta com coloração branca ou levemente corada, podendo produzir pigmentos creme no centro da colônia (**Figura 1A**) (VILAS BOAS; PACCOLA-MEIRELLES; LUNA-ALVES-LIMA, 1992).

Figura 01: Colônia de *Beauveria bassiana* (A). Células conidiogênicas de *Beauveria bassiana* (B).



Fonte: (PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016; CAMPOS et al., 2004).

B. bassiana possui alta patogenicidade e grande abrangência entomopatogênica. Esse fungo vem sendo estudado em todo o mundo como um micoinseticida (FERRON, 1978; BIDOCHKA et al., 1997), sendo já comercializado como pó solúvel de conídios para uso agrícola e doméstico (HASTUTI et al., 1999).

IMPORTÂNCIA DO CONTROLE BIOLÓGICO

A ocorrência de altas populações de insetos-praga é um problema sério a ser equacionado, tanto pelos prejuízos econômicos que ocasionam ao produtor, quanto pelas limitadas informações sobre os métodos de controle. O uso de inseticida comumente utilizado tem ocasionado impactos na saúde e no meio ambiente (MACEDO; MACEDO, 2004).

Esses produtos químicos proporcionam uma elevada produtividade, mas têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, a água, os animais, o homem, e provocam a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar (FRANCESCHINI et al., 2001).

O controle biológico realizado por intermédio de agentes microbianos mostra-se uma alternativa relevante e viável por não apresentar risco à saúde humana e contaminação ambiental (ALVES, 1998a). É uma técnica utilizada na agricultura para amenizar o uso de agrotóxicos (BUENO, 2000). Pode ser aplicado pela proteção ou manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno. A aplicação de um organismo exógeno em um meio ambiente a fim de controlar uma praga constitui-se no emprego do controle biológico clássico. Porém, é de fundamental importância controlar a adaptação e o sucesso deste agente exógeno no ambiente de aplicação, para que haja o controle da praga alvo de maneira harmoniosa e sem impactar outras espécies nativas (HOWARTH, 1996).

Nesse âmbito, o controle biológico é uma possibilidade para o combate de pragas e patógenos e lucrativo em relação ao controle químico, especialmente quanto à poluição, à

toxicidade, ao custo, à especificidade, ao controle mais duradouro e ao desenvolvimento de resistência (ALVES, 1998; FRANCESCHINI et al., 2001).

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os fungos filamentosos, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (ALVES, 1998b).

Entre os primeiros fungos entomopatogênicos utilizados no controle microbiano de insetos-praga, destacam-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH; PELL, 2003).

Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80 % das doenças causadas em insetos. Existindo cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos patogênicos de invertebrados já descritos. Apesar disso, a maioria dos trabalhos refere-se principalmente a duas espécies de fungos: *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (STUMER et al., 2003).

Nos estados do Nordeste, *B. bassiana* vem sendo utilizado com sucesso no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) (ALVES, 1998a). A ocorrência de altas populações de cigarrinhas é um problema sério a ser equacionado, tanto pelos enormes prejuízos econômicos que ocasiona, quanto pelas limitadas informações sobre os métodos de controle (MACEDO; MACEDO, 2004).

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *B. bassiana* no controle de ácaros, principalmente dos gêneros *Boophilus*, *Ripicephalus*, *Amblyoma*, *Ixodes*, sarnas dos Gêneros *Psoralea* e *Varroa* (BROOKS; WALL, 2001; DA COSTA et al., 2002; BENJAMIN et al., 2002; STURMER et al., 2004; VAREA et al., 2012).

Com relação ao modo de ação, de forma vantajosa a outros entomopatôgenos, que adentram no hospedeiro por via oral, *B. bassiana* penetra no inseto via tegumento. O processo de infecção de *B. bassiana* em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação. A infecção inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo sobre a superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da ação de enzimas extracelulares (esterases, proteases, lipases, e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. Estas enzimas degradam a estrutura de polímeros da cutícula formada por fibrilas quitinosas embebidas em matriz composta de proteínas. Na germinação, o conídio diferencia-se em um tubo germinativo com uma dilatação na extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico. Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que mantém o contato com a cutícula. Após atravessar a cutícula, *B. bassiana* encontra um ambiente rico em nutrientes, disseminando-se rapidamente através da hemolinfa por todos os tecidos, produzindo toxinas como as dextruxinas e citocalasinas, que ocasionam paralisia e consequentemente, a morte do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999).

A doença causada no inseto é denominada muscardine branca. Os sintomas observados após a infecção do hospedeiro incluem inquietação, perda da sensibilidade, perda de coordenação dos movimentos e paralisia, ocasionando a morte. O ciclo total da doença é de 8 a 10 dias. Os insetos infectados tornam-se duros e recobertos por uma camada pulverulenta de conídios. Ao final da conidiogênese, a colônia possui uma coloração esbranquiçada com uma massa de conídios brancos (ALVES, 1998b).

O inseto morre devido o esgotamento dos nutrientes, se houverem condições favoráveis, o fungo surge exteriorizando suas estruturas hifais e forma uma massa branca na superfície do cadáver (LAZZARINI, 2005).

CUPIM DO COQUEIRO

Os cupins são insetos da Ordem Isoptera, com cerca de 2.800 espécies catalogadas no mundo (GALLO et al., 2002). O gênero *Heterotermes* pertence à Subfamília Heterotermitinae e apresenta 51 espécies, das quais cinco ocorrem no Brasil. As espécies do gênero *Heterotermes* são conhecidas como praga agrícola e urbana, que causa sérios prejuízos econômicos em espécies vegetais *in vivo*, madeiras e derivados celulósicos.

Os cupins são considerados eussociais por apresentarem sobreposição de gerações dentro da mesma colônia com os mesmos descendentes ajudando nas tarefas coloniais. Também há ocorrência de membros que cooperam no cuidado com os mais jovens e divisão das tarefas reprodutivas com os indivíduos estéreis, trabalhando em benefício dos férteis (WILSON, 1971).

Heterotermes sp. possuem ninhos difusos no solo, em baixo de pedras ou vivem nos ninhos de outras espécies. Eles se alimentam de raízes, galhos, ramos, troncos de árvores e de material de plantas lenhosas em vários estágios de decomposição por fungos (MACEDO, 1995).

Os cupins (**Figura 2B**) apresentam o corpo dividido em três regiões: cabeça, tórax e abdômen. Um pequeno cervix ou pescoço, que conecta o tórax à cabeça também está presente. O corpo, principalmente a cabeça, são dorsoventralmente achatados (KRISHNA; WEESNER, 1969). A armadura bucal dos cupins é constituída por seis peças móveis localizadas na parte inferior da cabeça. Ela é do tipo mastigadora ou trituradora em alados e operários, sendo formada

pelo labro ou lábio superior, mandíbulas, maxilas, lábio ou lábio inferior, epifaringe e hipofaringe (COSTA-LEONARDO, 2002).

Os cupins são encontrados em lugares expostos, cobrem o alimento e constroem túneis ou galerias (**Figura 2A**) feitos a partir de saliva, fezes e partículas de solo, as quais estão sempre ligadas a um ou mais sítios de alimentação acima do solo (COSTA-LEONARDO, 2002).

Figura 02: Cupinzeiro no tronco do coqueiro (A) Cupins no interior do ninho (B).



Fonte:(PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016; <http://www.doutorcupim.com/p/bait-station.html>2004).

Os cupins são destacados por sua importância econômica como pragas de madeira e de outros materiais celulósicos. Além de causar considerável dano econômico em áreas urbanas e rurais, esses insetos também são importantes componentes da fauna de solo de regiões tropicais, exercendo papel essencial nos processos de decomposição e de ciclagem de nutrientes. Os cupins do gênero *Heterotermes* provocam dano às raízes, colo e caule, causando de perda do poder germinativo e prejudicando o desenvolvimento das plantas. Também atacam o cerne da planta, provocando perda de material lenhoso (KRISHNA; WEESNER, 1970).

O principal dano causado pelos cupins é oriundo da sua habilidade em digerir celulose. Também são considerados como pragas agrícolas por alimentar-se de várias partes de plantas

cultivadas, incluindo cana-de-açúcar, eucalipto, amendoim, frutíferas e outras. Sua expansão é facilitada pelo transporte de madeira pelo homem de uma região para outra e pelas condições favoráveis encontradas em cidades. O controle de cupins é feito quase que exclusivamente com produtos químicos, que se baseia no princípio da transmissão de agentes químicos ou microbianos diretamente para insetos atraídos, visando atingir toda a colônia (ALMEIDA et al., 1998).

Em estudo que foi analisado o controle de cupins de Montículo com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, foi relatado que o tratamento com o fungo *M. anisopliae* causou maior mortalidade dos cupinzeiros (100 % de eficiência) e os tratamentos com *B. bassiana* mostraram eficiência de 85,71 % (GUIRADO et al., 2009). Em estudo sobre a patogenicidade de *B. bassiana* sobre cupins urbanos também foi avaliado sobre a patogenicidade e observou-se que após 72 horas o número de insetos contaminados atingiu 100 %, mostrando que a utilização de *B. bassiana* é uma alternativa eficiente no controle biológico desse inseto-praga (SILVA, 2012).

SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA CULTIVO DE FUNGOS

Arroz (*Oryza sativa*)

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. É uma vantajosa fonte de energia, por sua alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais (WALTER et al., 2008).

O arroz é o substrato (**Figura 3**) mais utilizado para a produção de conídios. Isto se deve, provavelmente, à combinação de fatores como balanço nutricional, custo, ampla disponibilidade mundial, características físicas como tamanho e forma do grão, propriedades de hidratação e integridade estrutural mesmo após a colonização pelo fungo (DALLA SANTA et al., 2005).

Figura 03: Cultura do arroz (A). Grão do arroz (B).



Fonte: (<http://www.uagro.com.br>; PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016).

A produção do fungo no arroz pode ser feita em diferentes recipientes, conforme o objetivo e a escala de produção. Basicamente existem três processos de produção utilizando meios sólidos: produção em sacos de polipropileno, em garrafas de vidro e em bandejas (LEITE et al., 2003a). Para a produção de conídios em larga escala, para fins comerciais, têm sido utilizados grãos de arroz. O arroz é mergulhado em água aquecida, dentro de uma vasilha e pré-cozido por 15 minutos até obter a consistência emborrachada. Em seguida, o arroz pré-cozido é colocado dentro de frascos, sacos ou bandejas e autoclavado por 30 minutos (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006). Para produção de conídios no arroz uma suspensão de conídios é preparada e inoculada, seguido por homogeneização dos conídios por toda a massa de arroz, posteriormente o material é seco e ocorre a extração dos conídios secos, por meio de peneiras vibratórias (MASCARIN; QUINTELA, 2013).

Devido o elevado preço do arroz, o custeio do substrato para o fungo tem acarretado despesas crescentes aos produtores de conídios. Estudos têm sido realizados desde a década de 80 com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos, incluindo substratos

agroindustriais (ALVES et al., 1997a), promovendo uma tendência para a regionalização da produção (ALVES et al., 1997b).

Outros substratos têm sido utilizados como meio de cultura alternativo para produção de conídios em meios sólidos, tais como: arroz vermelho (AGOSTINETTO et al., 2001); resíduos de mandioca e fécula (CEREDA, 1996) e melaço (DALLA SANTA et al., 2005), dentre outros. Esses substratos têm representado uma alternativa viável e mais barata para a produção de fungos entomopatogênicos. Além disso, tais substratos são potenciais substratos para produção de enzimas de interesse biotecnológico, como α -amilases, celulasas, quitinases.

Algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) d. C.)

A algaroba foi introduzida no Brasil, principalmente no Nordeste, há mais de 50 anos. É uma leguminosa não oleagionosa, pertencente ao Gênero *Prosopis*, à Família Leguminosae e a Subfamília Mimosoideae. Constitui-se numa das raras espécies capazes de possibilitar aos animais e ao próprio homem uma convivência harmoniosa com o fenômeno adverso e periódico das secas (LIMA et al., 1983).

A algaroba apresenta ótima capacidade de adaptação em diversas localidades. Foi implantada no Nordeste na década de 1940, como uma alternativa para aumentar a disponibilidade de recursos naturais das áreas semiáridas, principalmente para alimentar animais e também para ser uma alternativa de reflorestamento em áreas desmatadas do bioma caatinga. A algaroba foi escolhida para essa missão, pois apresenta resistência a períodos longos de estiagem (SILVA, 1989).

Essa espécie é utilizada para a produção de madeira, de carvão vegetal, de álcool, de melaço e na alimentação animal e humana. Sendo considerada uma espécie de alto valor

econômico e social. No Nordeste brasileiro, essa xerófita aparece, atualmente, como uma possível fonte de alimento funcional para o homem (LIMA et al., 1983; SILVA et al., 1990). Algaroba pode ser considerada uma árvore de múltiplos usos, especialmente em regiões mais secas. Essa característica permite que a espécie seja utilizada para diversos fins socioeconômicos, desde que a população rural realize o aproveitamento adequado dos seus recursos (RIBASKI et al., 2009).

A algaroba apresenta arbustos de tamanho médio ou árvores de grande porte (**Figura 4A**), que podem atingir até 20 metros de altura, com tronco de mais de um metro de diâmetro (SILVA, 2003). Esta planta produz grande quantidade de vagens de alto valor alimentício apresentando excelente palatabilidade e boa digestibilidade, com composição química variável, que está na dependência do local onde é produzida. As espécies do Gênero *Prosopis* apresentam grande resistência à seca, e por ser uma leguminosa possui alta capacidade de fixar nitrogênio ao solo e repassar ao ecossistema associado a essa cultura (MENDES, 1982).

Figura 04: Cultura da algaroba (A). Vagem (B). Vagem da algaroba processada para cultivo de *Beauveria bassiana* (C).



Fonte: (<http://www.focadoemvoce.com/noticias/algarobeira>; <http://riocon.com.br>; PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016).

O fruto da algaroba é um legume com elevados teores de proteínas e carboidratos (**Figura 4B**). Variam em tamanho, cor e características químicas. Seu valor nutritivo se concentra nas vargens (**Figura 4C**) apresentando rica fonte de carboidratos e proteínas, com valor energético bruto comparável ao milho (CRUZ, 2015). Apresenta em sua composição química de 25-28 % de glicose, 11-17 % de amido, 7-11 % de proteínas, 14-20 % de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias (SILVA, 2001).

Bagaço da Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

A cana-de-açúcar é uma planta semi-perene, de clima tropical e subtropical e pertence à Família Poaceae (VIDAL; TREZZI, 2011). É uma planta de suma importância para a economia brasileira, tornando-se grande geradora de empregos e de energia via industrialização para produção de açúcar e álcool (MANZANO, 2000).

É considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil (**Figura 5A**). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, estima-se que são gerados cerca de 250 kg de bagaço. Este montante aponta o bagaço da cana-de-açúcar como o resíduo agroindustrial, de natureza lignocelulósica, mais abundante no Brasil (LORENCINI, 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar é (**Figura 5B**) obtido após a moagem nas usinas que produzem açúcar e álcool (PANDEY et al., 2000; MARTIN et al., 2002).

Figura 05: Cultura da cana-de-açúcar (A). Bagaço da cana-de-açúcar (B).



Fonte: (www.sifaeg.com.br; PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016).

É constituído basicamente de material lignocelulósico, tendo como componentes principais celulose, fibras e ligninas. Apresenta em sua constituição açúcares, principalmente na forma de sacarose e fibras, que são os principais componentes da cana-de-açúcar (PEREIRA et al., 2001). O bagaço é composto de aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY et al., 2000).

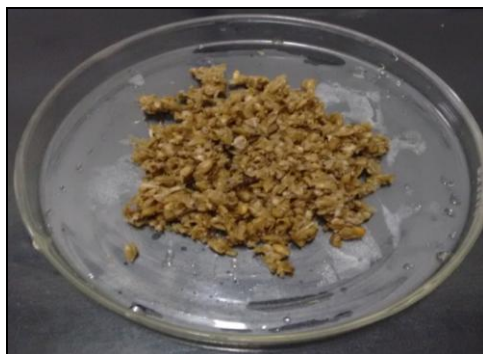
Um dos papéis biológicos desenvolvidos por micro-organismos é a degradação de matéria orgânica, por meio das quais devolvem micro e macro nutrientes para o ecossistema (SANTOS, 2010). Nos últimos anos, há um grande interesse na utilização desses resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como conídios conhecidos como propágulos fúngicos, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009).

Resíduo de cervejaria – Malte

O resíduo úmido da produção de cerveja, também chamado de farelo ou bagaço de cevada (**Figura 6**), pode ser descrito com uma massa resultante da aglutinação da casca com

resíduos do processo de mosturação. Ele apresenta concentrações significativas de proteína e carboidratos mais elevada do que as encontradas em seus cereais de origem como a cevada, o trigo, o centeio, o milho, o arroz, entre tantos outros (CLARK, 1987).

Figura 06: Resíduo de malte.



(Foto: PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016)

A constituição do resíduo úmido de cervejaria pode ser representada por 10 % de gorduras, 22 % de proteínas, 35 % de hemicelulose, 20 % de celulose, 10 % de lignina e 3 % de cinza. Porém, essa composição química pode variar de acordo com as condições de malteação e mosturação (HUIGE, 1994; REINOLD, 1997).

O resíduo ou bagaço de malte obtido durante o processo de mosturação é resultado da moagem, maceração, filtração e fervura do malte com adição do lúpulo (CLARK, 1987). Os altos índices de proteínas e açúcares resultantes das reações de hidrólise do conteúdo amiláceo do cereal são os maiores atrativos neste resíduo (CABRAL FILHO, 1999).

Fibras e Sementes de Acerola (*Malpighia glabra* L.)

A acerola ou cereja-das-Antilhas é uma fruta vermelha originária da América Central (**Figura 7A**) (MARINO NETTO, 1986). Pertence à Família Malpighiaceae, Gênero *Malpighia* (OLIVEIRA et al., 2003), amplamente cultivada nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil.

Figura 07: Cultura da acerola (A). Fibra de acerola – descarte industrial (B). Semente de acerola – descarte industrial (C).



Fonte: (www.jardimexotico.com.br; PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016).

Dentre os constituintes químicos presentes na acerola, destacamos a presença de carboidratos, lipídios, proteínas e grande quantidade de fibras. A grande utilização desse fruto na indústria de polpas de sucos vem gerando o descarte inadequado dos resíduos (cascas e sementes). Durante o processamento de acerola para produção de suco ou de polpa congelada, a prensagem das frutas produz um resíduo altamente fibroso (**Figura 7B e 7C**), ainda de coloração vermelha bastante intensa (MOREIRA, 2007). Este resíduo é muitas vezes descartado, gerando um enorme volume de lixo orgânico durante a safra de acerola. Uma maior quantidade do mesmo, no meio ambiente, gera uma poluição que poderia ser minimizada com a sua utilização para o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos e produção enzimas através da fermentação em estado sólido (MARINO NETTO, 1986).

Nos últimos anos, tem se dado uma atenção especial para minimizar ou reaproveitar resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos originários da indústria de alimentos envolvem quantidades significativas de casca, caroço e outros. Esses resíduos, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de carbono, energia e proteínas, passíveis de recuperação e aproveitamento. Além disso, sua utilização permite a diminuição do volume de resíduos descartado no ambiente gerando assim produtos com relevantes aplicações na indústria e biotecnologia (ROBERTO et al., 1996; WANDERLEY et al., 2011).

ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR FUNGOS

Enzimas Proteolíticas

As proteases são enzimas com função de hidrolisar ligações peptídicas de moléculas proteicas e peptídeos. Formam um grupo único de enzimas que ocupam uma posição central com aplicações em vários campos da indústria (KUMAR; TAKAGI, 1999). As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (UYAR; BAYSAL, 2004). São pertencentes ao grupo das hidrolases que tem em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo à transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994).

Segundo Enzyme Commission (EC) as proteases são classificadas no grupo 3 (hidrolases) e sub-grupo 4 (hidrolisam ligações peptídicas), família EC 3.4. Tais enzimas podem ser divididas em dois grupos principais, dependendo da posição da ligação peptídica clivada.

As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas a partir das extremidades aminoterminal e carboxiterminal do substrato. Já as endopeptidases atuam na clivagem interna da cadeia polipeptídica. As endopeptidases se classificam de acordo com o aminoácido presente no seu sítio ativo e podem ser subdivididas em serina (EC 3. 4. 21), cisteína (EC 3. 4. 22), aspártico (EC 3. 4. 23) e metalo-protease (EC 3. 4. 24) (NC-IUBMB, 2011; HSIAO et al., 2014).

Devido à sua ampla aplicabilidade e ao seu alto custo de obtenção, tem-se buscado meios alternativos de produção. Utilizando para esse fim, meios de cultura de baixo custo, levando em consideração que aproximadamente 30 a 40 % dos custos envolvidos na sua produção estão relacionados ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo. Portanto sua otimização é de grande importância para a definição de alternativas de produção economicamente viáveis (SHIKHA; DARMWAL, 2007; MUKHERJEE et al., 2008).

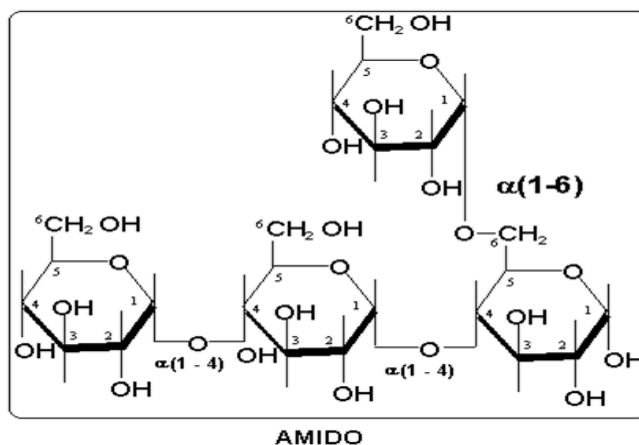
Nos últimos anos, uma diversidade de subprodutos da indústria agrícola ou resíduos agroindustriais têm sido estudados com a finalidade de formular substratos para produção de protease que proporcionam grande potencial de reuso devido à sua composição e características (LADEIRA, 2010).

Enzimas Amilolíticas

O amido (**Figura 8**) é um carboidrato solúvel, produzido em grande quantidade nas folhas dos vegetais, como forma de armazenar temporariamente os produtos da fotossíntese (MELLO JR., 1991). É o segundo polímero mais abundante encontrado na natureza, apresentando em sua composição dois compostos de elevado peso molecular que compõem sua

estrutura, a amilose e a amilopectina, aparecendo na proporção média de 25 % e 75 %, respectivamente (AGUERO, 1998). São constituídos por moléculas de glicose unidas por ligações α - 1,4 e α -1,6 (MYERS et al., 2000).

Figura 08: Estrutura química do amido.



(<http://reocities.com/CapeCanaveral/launchpad/9071/amido14>)

A amilose é uma molécula formada por cadeias lineares compostas por unidades de glicose ligadas uniformemente por ligações glicosídicas α -1,4, que conferem forma helicoidal a molécula. Tal como a amilose, a amilopectina é constituída por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4, diferindo desta por apresentar ligações α -1,6 que constituem pontos de ramificação. Devido a essas diferenças estruturais, a amilose é mais hidrossolúvel que a amilopectina, e essa característica pode ser usada para separar esses dois componentes. A mesma característica constitui um fator importante para explicar a atuação das enzimas sobre o amido e a sua aplicação em processos industriais (DZIEDZIC; KEARSLEY, 1984; SCHENCK; HEBEDA, 1992).

As amilases têm a função de hidrolisar moléculas de amido liberando diversos produtos, como dextrinas, ciclodextrinas, maltose e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Podem ser divididas em quatro grupos: α -amilases, que rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases) liberando dextrinas lineares e ramificadas; isoamilases, que atuam nas ramificações do amido (desramificantes); β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não-redutoras do substrato (exoamilases) tendo como principal produto maltose; glucoamilases (amiloglucosidases) também atuam nas extremidades não-redutoras da molécula de amido, liberando unidades de glicose (SPIER, 2005).

As amilases são originárias de várias fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. Dentre os micro-organismos destacamos os fungos filamentosos como potenciais produtores de amilases (PANDEY et al., 2000).

B. bassiana produz exoenzimas que estão envolvidas no processo de penetração do tegumento do hospedeiro. Em decorrência desta produção enzimática inerente ao processo de infecção do fungo em relação ao inseto-praga, ao expor o fungo a substratos não convencionais, estimula e promove a produção de enzimas de interesse industrial (BIDOCHKA; KACHATOURIANS, 1990; VALADARES-INGLIS; AZEVEDO, 1997). Dentre essas enzimas, destaca-se a amilase que pode ser produzida por vários tipos diferentes de culturas microbianas. O *Aspergillus niger*, por exemplo, tem a capacidade de produzir diferentes tipos de enzimas, dependendo da indução e do substrato (SANTANA, 2012).

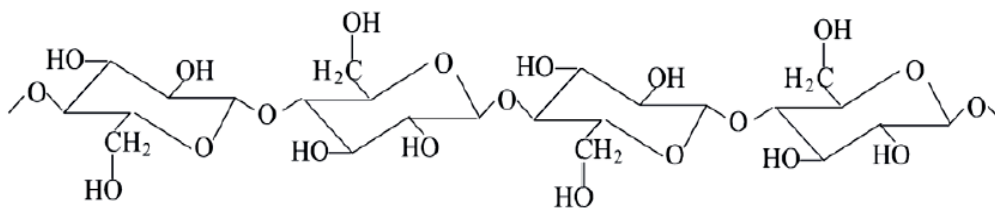
Enzimas Celulolíticas

A celulose tem função estritamente estrutural e é o principal componente da parede primária das plantas, sendo o biopolímero mais abundante do mundo (BAYER; LAMED, 1993;

MANSFIELDS; MEDER, 2003).

A celulose (**Figura 9**) é um homopolissacarídeo linear formado por microfibrilas que são estruturas rígidas, as quais contribuem para a resistência estrutural da parede celular, estando firmemente empacotadas em cadeias de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (KIMURA et al., 1999). Cada microfibrila pode ser constituída por 36-1200 cadeias de celulose que são mantidas por ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*, compondo uma estrutura cristalina e ordenada. A unidade repetitiva da base da celulose é a celobiose, um dissacarídeo de glicose (SHARMA et al., 2016).

Figura 09: Estrutura química da celulose



Fonte: (FRANCHETTI; MARCONATO 2006).

As enzimas celulolíticas têm a função de catalisar a hidrólise da celulose e são produzidas por vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016).

São constituídas por um complexo enzimático onde a hidrólise total da celulose ocorre

somente a partir de três componentes que atuam sinergicamente. Esse grupo de enzimas está dividido de acordo com seu mecanismo de ação. As celulasas podem ser agrupadas em três classes principais, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases iniciam a hidrólise, clivando o polímero de celulose nas regiões internas da estrutura amorfa e liberando oligossacarídeos. Já as exoglucanases, rompem a celulose e celo-oligossacarídeos maiores liberando celobiose. O terceiro grupo é a β -glicosidase que cliva a celobiose em duas moléculas de glicose (MAEDA et al., 2013).

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Fermentação Estado Sólido - (FES)

Existe uma perspectiva para utilização de processos fermentativos em estado sólido na produção de enzimas de interesse industrial. Este processo é caracterizado pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos e porosos, na ausência de água livre entre as partículas da matriz sólida, onde micro-organismo pode crescer entre os fragmentos ou sobre a superfície do substrato, consumindo-o e secretando metabólitos, dentre eles as enzimas (RAHARDJO et al., 2005; MITCHELL et al., 2006a).

A FES usando substratos facilmente disponíveis e de baixo custo vem sendo empregada, predominantemente, em países orientais, para a obtenção de produtos de importância comercial (GUTIERREZ-ROJAS; TORRES, 1992). São utilizadas várias fontes de carbono na formulação do meio de fermentação, entre elas podemos destacar o farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de frutas, resíduos de tubérculos, cascas de sementes, arroz vermelho, resíduo de cervejaria, entre outros (CORDOVA et al., 1998; SILVA et al., 2000;

ALONSO, 2001; ÖGEL et al., 2001; ELLAIAH et al., 2004; DOGARIS et al., 2009; SENE et al., 2010).

É uma técnica vantajosa, pois além de simular o *habitat* natural de micro-organismos (principalmente fungos filamentosos), apresenta maior produtividade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas (RODRIGUES-ZÚNIGA et al., 2011). Sendo assim, uma forma muito útil como estratégia de cultivo, permitindo a penetração das hifas nos poros entre as partículas dos substratos, auxiliando as trocas gasosas entre as células, para manutenção metabólica (HOLKER; LENZ, 2005). Apresenta como vantagens também o baixo custo das matérias-prima empregadas no meio de cultivo, a simplicidade do meio de fermentação utilizado, a menor probabilidade de contaminação do meio pela menor quantidade de água livre presente e a possibilidade de obtenção da enzima extracelular mais concentrada (ALONSO, 2001; MARTINS, 2001).

Apesar da FES proporcionar vários benefícios, algumas limitações são observadas, como a dificuldade no controle dos parâmetros como aeração, pH, temperatura, umidade e a homogeneidade do meio são questões que dificultam a produção de substâncias de interesse em grande escala (MARTINS, 2001; COUTO; SANROMÁN, 2006).

EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Um dos principais fatores que afetam e interferem no desenvolvimento do micro-organismo é a temperatura (MADIGAN et al., 2004). Sendo o fator que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas (GOMES et al., 2007).

Existem algumas espécies de fungos termofílicos, que têm afinidade por temperaturas elevadas, apresentando temperaturas ótimas de crescimento entre 40° e 50° C e hipertermofílicos com temperatura ótima de crescimento em torno de 80° C (MADIGAN et al., 2004). Estes fungos produzem enzimas que são estáveis a temperaturas mais elevadas. Esta termolabilidade está relacionada às adaptações da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA a temperaturas elevadas (GOMES et al., 2007).

O interesse científico pelos micro-organismos termofílicos tem ganhado amplitude, pois apresentam uma grande potencialidade, como a produção de enzimas termoestáveis. As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria e na biotecnologia (PALMA-FERNANDEZ et al., 2002). Pois, possuem a capacidade de permanecer com sua estrutura íntegra em temperaturas acima de 55° C. Geralmente apresentam maior atividade específica e maior estabilidade. Finalmente, essas enzimas podem ser armazenadas em temperatura ambiente sem perda de atividade (YEOMAN et al., 2010).

IMPORTÂNCIA E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA

As enzimas podem ser utilizadas em muitos processos biotecnológicos. No mercado industrial, estão distribuídas em diferentes áreas ligadas a ciência e a tecnologia (ORLANDELLI, 2012).

Vários processos industriais que envolvem reações químicas necessitam da utilização de enzimas para atuarem como catalisadores. As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais viáveis. Observamos notavelmente que mais processos industriais

utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam as áreas de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e indústria têxtil (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A produção de enzimas de interesse biotecnológico vem ocorrendo a partir de processos tradicionais podendo ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de micro-organismos. Entretanto, as de origem microbiana são mais utilizadas por possibilitar o emprego de substratos de baixo custo em seu processo de produção. Após a escolha do micro-organismo, inicia-se o processo de fermentação para a produção das enzimas, o controle de parâmetros como pH e temperatura são essenciais para otimização do processo (MONTEIRO; SILVA, 2009; ORLANDELLI, 2012).

Dentre as enzimas produzidas por micro-organismo, destacam-se as proteases, amilases e celulasas. As proteases ocupam o primeiro lugar, dentre as já citadas, no mercado

mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas das amilases (MICHELIN, 2005; ORLANDELLI, 2012).

As proteases microbianas são amplamente utilizadas no processamento de couros, para remoção dos pêlos (ABRAHÃO NETO, 2001; ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008). Também são utilizadas no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, enriquecimento proteico de rações para animal (HAKI; RAKSHIT, 2003; REDDY et al., 2008), produção de laticínios (ORLANDELLI, 2012), entre outras aplicações.

As enzimas amilolíticas também apresentam papel de grande importância na indústria e biotecnologia, atuando nas áreas de alimentos como a sacarificação do amido (produção de xaropes), nas indústrias de bebidas fermentadas e também nos setores têxtil e de papeis, indústria

química e farmacêutica, e por fim, na pecuária atuando na melhor digestibilidade da ração animal (PANDEY et al., 2000; BARATTO et al., 2011).

As celulasas são utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, na formulação de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal tendo uma ampla variedade de aplicações industriais (BHAT, 1997). Também são aplicadas como aditivos alimentares, promovem a hidrólise de biomassa lignocelulósica, tratamento de resíduos (YEOMAN et al., 2010), na indústria de papel e celulose, têxtil, alimentos e bebidas, indústria de detergentes e ração animal. Essas enzimas são relativamente caras e uma significativa redução do custo seria importante para seu uso comercial (ZHANG, 2006).

Observa-se a variedade de aplicações e a importância das enzimas na indústria, todavia, o custo com a matéria-prima para a produção enzimática é um dos componentes mais importantes no processo industrial (BON et al., 2008). Cerca de 30 a 40 % do custo da produção de enzimas corresponde a fonte de carbono, ou seja, o substrato utilizado para o crescimento do micro-organismo (JOO; CHANG, 2005). Sendo assim, esta é uma das razões para o crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000). Os resíduos agroindustriais são oriundos de diversas áreas como as usinas sucroalcooleiras, indústrias do processamento de carnes, laticínios, grãos, frutas e hortaliças (DANTAS; AQUINO, 2010). Vários autores destacam a utilização de resíduos da agroindústria, visando obtenção de produtos de interesse comercial como as enzimas, com resultados satisfatórios barateando os custos de produção (AZEREDO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; SOUZA, 2012).

CAPÍTULO I

Produção e viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos brutos

**Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães¹ • Kristerson Reinaldo de Luna Freire² •
Sharline Florentino de Melo Santos³ • Andréa Farias de Almeida⁴ • Adna Cristina Barbosa
de Sousa^{1,2}**

¹Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-Mestrado

²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular

³Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

⁴Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia

O trabalho será submetido à Revista *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology

Resumo

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin é um fungo promissor no controle biológico de insetos-praga. As crescentes despesas na produção de conídios levantam a necessidade de averiguar a eficiência de alguns substratos com propriedades nutricionais, baixo custo e fácil obtenção. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de utilização de diferentes substratos brutos à base de arroz, fibra da algaroba, resíduos de malte, sementes e fibras de acerola e bagaço da cana-de-açúcar para a conidiogênese. A produção e viabilidade dos conídios foram realizadas em *erlenmeyer* de 250 mL contendo 30 g de cada substrato, 0,3 µL da suspensão de conídios (1×10^6 conídios/mL). Após 10 dias de incubação (umidade de 70 ± 10 % e temperatura ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$), os substratos arroz polido ($2,00 \times 10^6$ conídios/g de substrato), malte A ($1,22 \times 10^6$ conídios/g), malte B ($1,75 \times 10^6$ conídios/g) e fibra de algaroba ($2,36 \times 10^6$ conídios/g), apresentaram maior produção de conídios. A viabilidade dos conídios produzidos nesses substratos apresentou porcentagem de germinação em torno de 99 %. A patogenicidade dos conídios de *B. bassiana* produzidos nos diferentes substratos foi avaliada no cupim do coqueiro. A taxa de mortalidade após infecção com os conídios produzidos superaram 80 % de mortalidade com exceção do grupo controle. Os substratos brutos utilizados para crescimento da *B. bassiana* podem fornecer uma redução de aproximadamente 50 % nos custos de produção de fungos entomopatogênicos.

Palavras chave: Controle biológico, substratos naturais, fungo filamentoso.

Introdução

O controle de pragas em sua maioria tem sido realizado por meio de agrotóxicos, gerando problemas de intoxicação humana e da fauna silvestre, resíduos nos alimentos, na água e no solo, aparecimento de novas pragas e de populações resistentes a esses produtos (ALVES et al., 2008b).

Em busca de técnicas e soluções ecologicamente corretas, devido em grande parte à conscientização em relação ao mau uso de agrotóxicos, o controle biológico de pragas por intermédio de agentes microbianos é considerado muito promissor e dentre os agentes de controle microbiano de pragas de importância econômica destacam-se os fungos, devido à abundância de gêneros e espécies (ZIMMERMANN, 1982; ALVES, 1986b e 1992).

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* se destaca como um importante agente no controle biológico de pragas. É comumente encontrado parasitando insetos e possui especificidade em mais de 200 espécies de insetos-praga (ALVES, 1998). As estruturas produzidas e comercializadas das diferentes espécies de fungos entomopatogênicos são os conídios e o meio padrão utilizado é arroz branco, devido a sua capacidade de conservar a umidade e ser rico em carboidratos (ALVES, 1998).

Porém dependendo do objetivo, da escala de produção sobre meio de cultura sólido e do tempo de conservação até a utilização dos mesmos, torna-se caro e inviável. Um dos principais fatores para o sucesso do controle biológico utilizando a *B. bassiana* é a produção de grande quantidade de conídios por um preço competitivo. Assim, o processo de produção deve ser barato e ao mesmo tempo produzir conídios viáveis e virulentos (ROBL et al., 2009).

Visando à redução de custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, substratos naturais, tais como painço, quirela de milho, trigo em grão (EL DAMIR, 2006),

farinha de tapioca, batata doce, extratos de abóbora e mamão (IBRAHIM; LOW, 1993), mistura de farelo e casca de arroz, cevada (DORTA et al., 1990; NELSON et al., 1996), entre outros, vêm sendo utilizados, apresentando resultados promissores para produção de *B. bassiana*. Tendo em vista esses aspectos, os estudos básicos de avaliação e seleção de novos substratos como fibra da algaroba, resíduo de malte, acerola (sementes e fibras) e bagaço da cana-de-açúcar, além de propriedades nutricionais importantes para o crescimento do fungo, possuem grande disponibilidade e baixo custo.

A utilização de substratos brutos não convencionais sem a adição de suplemento nutricional para o crescimento fúngico trará novas perspectivas para o estudo da produção de *B. bassiana*, promovendo avanços em direção aos estudos do controle biológico de pragas, avaliação do crescimento, viabilidade dos conídios e patogenicidade. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo analisar o potencial de utilização de diferentes substratos para conidiogênese a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Material e Métodos

Linhagem fúngica: foi utilizada uma linhagem de *B. bassiana* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (**Tabela 1**).

Tabela 01: Origem da linhagem de *Beauveria bassiana*

<i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin	
Nº. do acesso	•URM 2915
Substrato	<i>Nezara viridula</i>
Origem geográfica	*CENARGEM/PR
Ano de registro	1987

•URM - University Recife Mycologia; *CENARGEM - Centro Nacional Agropecuário de Recursos Genéticos.

Origem dos insetos: Os cupins (*Heterotermes* sp.) foram coletados do cultivo de coco, no município de Alhandra/PB.

Origens dos substratos: foram utilizados cinco substratos especificados na **Tabela 2**.

Tabela 02: Origens dos substratos

Substrato	Origem
Arroz polido (substrato padrão)	Produto comercializado
Resíduos de malte A e B	Laboratório de Química Orgânica Aplicada CBiotec - UFPB (João Pessoa - PB)
Bagaço da cana-de-açúcar	Barraca de caldo-de-cana (João Pessoa - PB)
Acerola - fibras e sementes	Indústria Polpas de Frutas Ideal (João Pessoa - PB)
Algaroba – fibras	Cidade Japi/RN (Região do Semiárido)

Dentre os substratos citados na **Tabela 02**, destacam-se os resíduos de malte cervejeiro e a fibra de algaroba, pelo ineditismo da utilização desses substratos na produção de conídios. Os resíduos de malte cervejeiro foram coletados ao final da etapa de clarificação e lavagem do mosto do processo artesanal da produção cervejeira. O malte B foi coletado quando o mosto originário da etapa de lavagem atingiu a densidade específica de 1,010, enquanto que o malte A foi coletado quando a densidade específica do mosto alcançou 1,005. A densidade do mosto

reflete a concentração de sólidos solúveis nele contido, principalmente de açúcares (fermentescíveis e dextrinas). Já para o substrato algaroba, utilizou-se as suas fibras após um processo de prensagem das vagens. A vagem de algaroba foi prensada em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50kgf/cm^2 , conforme metodologia de Silva et al. (2009). O resíduo fibroso resultante da prensagem dessas vagens (fibra da algaroba) foi utilizado como substrato no processo de fermentação em estado sólido.

Prensagem da algaroba: as vagens de algaroba foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas em uma balança eletrônica (Gural - modelo Esse - 15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram sanitizadas imergindo-as em uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos, a remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a $65 \pm 2^\circ\text{C}$, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, as vagens hidratadas foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50Kgf/cm^2 (SILVA et al., 2003).

Meio de manutenção da linhagem fúngica: ágar-Sabouraud-dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 5,6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4°C .

Produção de conídios: o fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (esporulação) (Meio Completo - MC) (ALVES, 1998a). Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C e fotofase de 12 horas, por um período de 7 a 10 dias para crescimento e conidiogênese do fungo. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferidos para tubos de ensaio fechados com filme PVC e armazenados sob

refrigeração a 4° C por um período não superior a 10 dias. Para o preparo da suspensão, foram adicionados aos conídios água destilada + “tween” 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de *Neubauer* e as suspensões foram padronizadas em 1×10^6 conídios/mL.

Teste preliminar para ajustar a umidade dos meios de cultura para 70 %: o teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 30 g de cada substrato, contidos em *erlenmeyer* de 250 mL. Os *erlenmeyers* foram autoclavados e, após resfriamento, foram feitas as pesagens. Em seguida, os *erlenmeyers* foram levados à estufa (80° C) para secagem dos materiais até o peso constante. Posteriormente, foi realizada uma nova pesagem e, após a subtração da massa seca, foi calculado o volume de água adicionado a cada substrato de forma a resultar numa umidade em torno de 70 % após a autoclavagem. O volume de líquido adicionado ao meio foi baseado na equação especificada abaixo:

$$m_{H_2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2}$$

Sabendo que:

m_s = massa de substrato

x_1 = umidade inicial do substrato

x_2 = umidade desejada

Avaliação da produção de *Beauveria bassiana* em diferentes substratos: foram utilizados cinco diferentes substratos ricos em carboidratos (**Tabela 2**). O experimento foi realizado em *erlenmeyer* de 250 mL, contendo 30 g do substrato com umidade em torno de 70 %. Foram preparados três frascos para cada substrato. Foram inoculados 1×10^6 conídios/mL e em seguida

os frascos foram incubados ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$) e analisados durante 10 dias. Após esse período, foi adicionado 0,9 de água destilada + “*tween*” 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 e coletado uma alíquota de 0,1 mL para realização da contagem dos conídios em câmara de *Neubauer* ao microscópio óptico (SENE et al., 2010).

Avaliação da viabilidade dos conídios: Amostras dos conídios produzidos nos diferentes meios foram tomadas e submetidas a diluições seriadas, até se obter uma concentração de 1×10^6 conídios/mL. Desta suspensão, inoculou-se, em triplicata, 100 mL em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), que em seguida foram incubadas por 18 horas ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Após esse período, foram realizadas as contagens em cada placa, de 200 a 300 conídios viáveis ou não, sob microscópio de luz (aumento de 400×) (SENE et al., 2010).

Bioensaio: avaliação da atividade inseticida: foram utilizados 45 cupins. Foi realizado um experimento com três repetições de 15 cupins para cada tratamento. Os cupins foram imersos por 10 segundos em água destilada autoclavada + “*tween*” (0,01 %) contendo uma suspensão de conídios (1×10^6 conídios mL^{-1}). Posteriormente, os cupins foram transferidos individualmente para placa de *Petri* contendo uma dieta artificial (folha seca e pedaços do caule do coqueiro). As placas foram mantidas em temperatura ambiente e avaliadas a cada 24 horas durante 10 dias. O controle negativo foi realizado imergindo os insetos em água destilada autoclavada + “*tween*” (0,01 %) e mantendo-os nas mesmas condições citadas anteriormente (ALVES, 1998b).

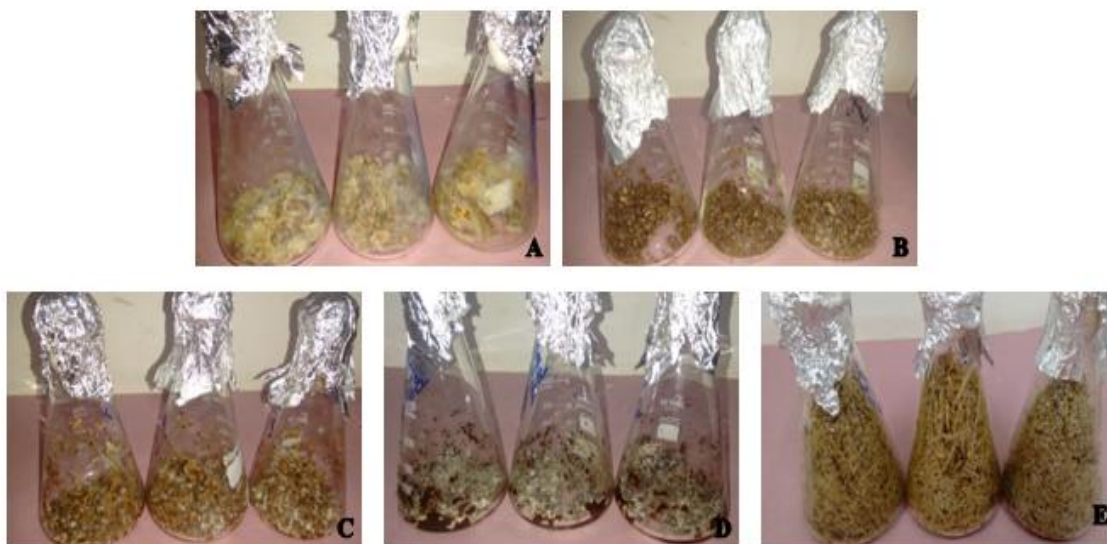
Análise estatística: os experimentos foram realizados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os dados obtidos analisados estatisticamente quanto à variância (teste *F*) e as médias comparadas entre si (Teste de *Tukey*), ambos ao nível de 5,0 % de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2003).

Resultados e Discussão

Avaliação do crescimento de *Beauveria bassiana*

O crescimento micelial de *B. bassiana* foi avaliado durante 10 dias no arroz polido (substrato padrão), fibra da algaroba, resíduos de malte (malte A e malte B), semente de acerola, fibra de acerola e bagaço de cana-de-açúcar. A **Figura 1** ilustra o aspecto macroscópico de *B. bassiana*, exibindo variação quanto ao crescimento.

Figura 01: Aspecto macroscópico da colonização de *Beauveria bassiana* na fibra de algaroba (A), malte A (B), malte B (C), fibra de acerola (D) e bagaço de cana-de açúcar (E) após dez dias de crescimento.



Fonte: (PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016)

O arroz polido foi utilizado como padrão porque atualmente é o substrato mais empregado na produção para comercialização de conídios, devido a uma combinação de fatores como, características nutricionais, conservação da umidade, preço, ampla disponibilidade mundial e características físicas como tamanho e forma do grão (JENKINS et al., 1998).

Após 10 dias de incubação os substratos arroz polido ($2,00 \times 10^6$ conídios/g de substrato), malte A ($1,22 \times 10^6$ conídios/g de substrato), malte B ($1,75 \times 10^6$ conídios/g de substrato) e fibra de algaroba ($2,36 \times 10^6$ conídios/g de substrato), proporcionaram maior produção de conídios. Os substratos bagaço da cana-de-açúcar ($0,85 \times 10^6$ conídios/g de substrato), semente de acerola ($0,56 \times 10^6$ conídios/g de substrato) e fibra de acerola ($0,54 \times 10^6$ conídios/g de substrato) proporcionaram uma conidiogênese menor (**Tabela 4**).

Esses diferentes resultados podem ser justificados pela textura e suporte nutricional de cada substrato. A fibra da algaroba apresentou considerável crescimento e produção de conídios por ser uma leguminosa rica em nutrientes com valor energético bruto comparável ao milho, exibindo em sua composição elevados teores de proteínas e carboidratos, quantidades significativas de nutrientes, favorecendo o crescimento microbiano e produção de conídios (CRUZ, 2015). O malte B durante o processo de produção da cerveja foi submetido a poucas lavagens, por isso obteve maior produção de conídios que o malte A (mais lavagens), devido à presença de maior teor de açúcares fermentescíveis. A densidade específica do mosto no final da etapa de recirculação/lavagem do malte B foi de 1,010 e do malte A foi de 1,005. Essa condição de coleta do malte justifica o melhor crescimento de *B. bassiana* no malte B.

O bagaço de cana-de-açúcar apesar de ser um substrato rico em polissacarídeos, e apresentar característica fibrosa que favorece a aeração e crescimento durante o cultivo, teve uma perda de umidade ao longo dos 10 dias de incubação. A perda de umidade levou à baixa disponibilidade de nutrientes, afetando o crescimento do fungo e produção de conídios (**Tabela 3**).

A semente e fibra de acerola também apresentou baixa conidiogênese em relação aos outros substratos utilizados (arroz, fibra da algaroba, malte A e B). Isso pode ter sido ocasionado

também, devido as diferentes concentrações de lignina presentes na composição das espécies vegetais.

Devido à grande rigidez e impermeabilidade conferida pela lignina a maioria dos fungos não conseguem quebrar esse composto químico. Lousada Júnior et al. (2006) encontrou em subprodutos da acerola, em média 18,4 % de lignina. Essa concentração é considerável e pode está relacionada à diminuição da germinação e crescimento de *B. bassiana* nestes substratos.

As espécies vegetais apresentam concentrações variáveis de lignina. Esse composto químico é um heteropolímero de estrutura tridimensional formado por unidades de fenilpropano. Está localizado ligada à celulose e à hemicelulose, unidos formando um laço físico que origina uma barreira blindada na parede celular das plantas, conferindo suporte a estrutura do vegetal, permeabilidade e resistência. Com isso, cria-se uma proteção física que protege a planta da ação de enzimas liberadas pelos microrganismos. Dessa forma, a presença da lignina na parede celular dificulta a hidrólise enzimática dos carboidratos (RABELO, 2007).

No presente trabalho foram utilizados substratos brutos sem pré-tratamento ou suplementação para o desenvolvimento do fungo, e essa condição pode justificar o baixo crescimento do microrganismo nesses substratos.

Alguns fatores ambientais como temperatura e umidade podem influenciar o crescimento e desenvolvimento do fungo. A variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *B. bassiana* após 10 dias de incubação em temperatura ambiente ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$) está descrita na **Tabela 3**.

Tabela 03: Variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *Beauveria bassiana* após 10 dias de incubação ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$).

Substratos	Umidade inicial (%)	Umidade final (%)
Arroz polido (meio padrão)	71,50	67,56
Malte A	76,67	68,99
Malte B	74,49	66,28
Fibra de Algaroba	76,98	69,03
Bagaço da cana-de-açúcar	66,87	55,98
Semente de acerola	71,78	61,17
Fibra de acerola	72,25	63,61
CV%	6,89	5,63

A umidade nos diferentes substratos utilizados variou ao longo dos 10 dias de cultivo. O malte A, malte B e fibra de algaroba proporcionaram maior produção de conídios e foram os substratos que ao decorrer do 10 dias tiveram as menores perdas de umidade, apresentando umidade final de 68,99 %; 66,28 % e 69,03 %, respectivamente.

Apesar da umidade final dos substratos utilizados ter variado de 55,98 % a 69,03 % e diferir da umidade relativa de 93 %, descrita por Webster e Gunnel (1992) onde o desenvolvimento do micélio é favorecido, todos os substratos testados apresentaram crescimento e esporulação do fungo.

Vale ressaltar que a umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a produção dos conídios. O substrato com a umidade adequada apresenta condições para que haja transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, se a umidade for muito baixa

pode prejudicar o crescimento do fungo, e conseqüentemente influenciará no produto final de interesse que são a produção e a viabilidade dos conídios.

Produção e viabilidade dos conídios

A produção média e a viabilidade de conídios (conídios/g) em diferentes substratos de *B. bassiana* esta apresentada na **Tabela 4**.

B. bassiana foi mais produtiva nos substratos de arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de $2,00 \times 10^6$; $1,22 \times 10^6$; $1,75 \times 10^6$ e $2,36 \times 10^6$ conídios/grama do substrato, respectivamente. A esporulação variou estatisticamente nos substratos bagaço da cana-de-açúcar, sementes e fibras da acerola ($0,85 \times 10^6$; $0,56 \times 10^6$ e $0,54 \times 10^6$, respectivamente).

A viabilidade dos conídios produzidos nos substratos arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba (**Figura 2**), após 72 horas da inoculação em temperatura ambiente, não diferiram estatisticamente entre si, com porcentagem de germinação de 99,96; 90,04; 93,17 e 98,21, respectivamente. O bagaço da cana-de-açúcar, a semente e a fibra da acerola diferiram estatisticamente, pois apresentaram menor capacidade de germinação (55,10 %; 68,29 % e 71,11 %, respectivamente) (**Tabela 4**).

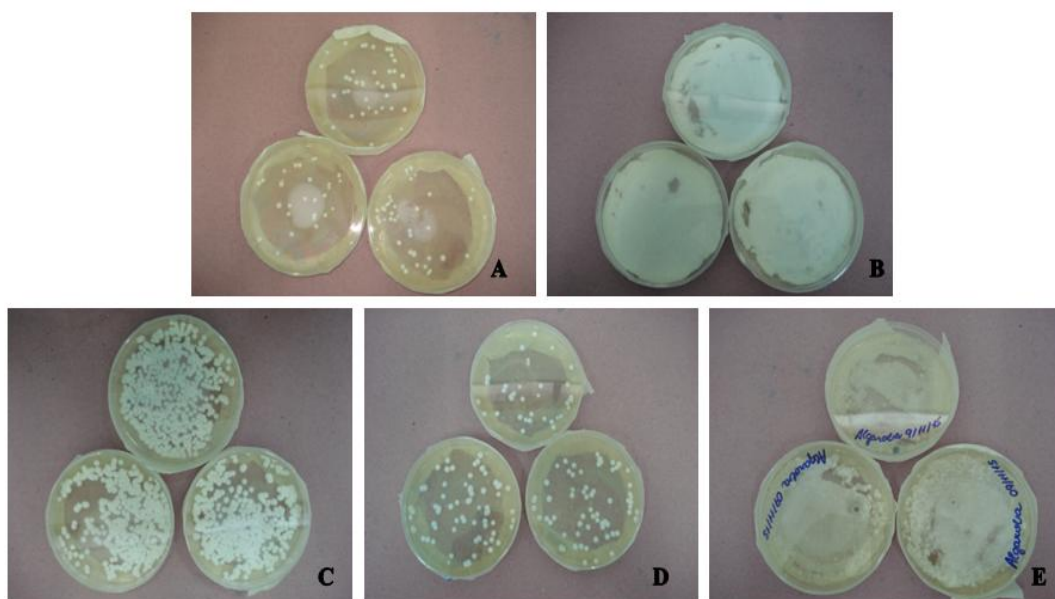
Tabela 04: Produção média e viabilidade de conídios (conídios/g) em diferentes substratos de *Beauveria bassiana* (T = 29 ± 1° C).

Substratos	Umidade (Volume de água destilada) ⁰	Produção de conídios (x 10 ⁶) ^{1,2} (±EP) ³	Viabilidade (%) ¹ (±EP) ³
Arroz polido (meio padrão)	30 Ml	2,00 ± 0,27 a	99,96 ± 0,16 a
Malte A	30 Ml	1,22 ± 0,20 ab	90,04± 0,23 a
Malte B	30 mL	1,75 ± 0,28 ab	93,17±0,25 a
Fibra de Algaroba	30 Ml	2,36 ± 0,31 a	98,21± 0,27 a
Bagaço da cana-de- açúcar	60 mL	0,85 ± 0,08 b	55,10 ± 2,83 b
Semente de acerola	30 mL	0,56 ± 0,04 b	68,29± 2,03 b
Fibra de acerola	20 mL	0,54± 0,02 b	71,11± 1,09 b
CV%⁴		21,68	7,48

⁰Volume de água destilada necessária para se obter 70 ± 10 % de umidade em 30 g de substrato bruto; ¹Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey;

²Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$; ³ Erro padrão da média; ⁴ coeficiente de variação.

Figura 02: Comportamento de *Beauveria bassiana* produzidos em diferentes substratos quanto à viabilidade dos conídios: A) bagaço da cana-de-açúcar; B) arroz polido; C) malte B; D) fibra da acerola; E) fibra da algaroba.



Fonte: (PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016)

As diferenças estatisticamente comprovadas na esporulação e na viabilidade dos conídios sugerem a carência de algum fator nutricional importante, associado à manutenção da umidade durante o processo de cultivo para a conidiogênese nos substratos bagaço da cana-de-açúcar, sementes e a fibras da acerola. Essa deficiência pode ter sido ocasionada pela redução na diferenciação morfológica da parte vegetativa do fungo, em estruturas reprodutivas, com consequente redução da produção de conídios e germinação dos mesmos.

B. bassiana é considerado um fungo eucárpico (ALEXOPOULOS et al., 1996). As estruturas reprodutivas surgem apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte restante, a forma vegetativa. O comportamento (crescimento e esporulação) é uma resposta à composição e ao enriquecimento do meio de cultivo. No entanto, a variação na concentração de nutrientes como fonte de carbono e a redução da umidade, pode justificar as diferentes respostas no desenvolvimento vegetativo *in vitro* do fungo, nos diferentes substratos.

Em estudo de seleção de isolados de *B. bassiana* para o controle da broca do café, obtiveram produções de conídios/mL em torno de $2,5 \times 10^6$ em cadáveres dos insetos da broca do café, mostrando semelhança com os resultados alcançados no presente estudo (NEVES; HIROSE, 2005).

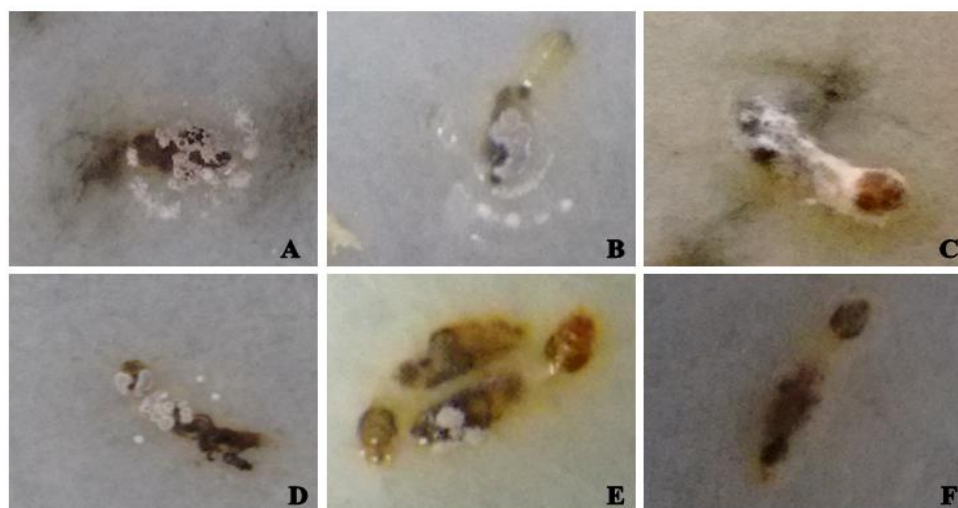
Em estudo realizado por Sene et al. (2010) a porcentagem de germinação de conídios do fungo *M. anisopliae* produzidos no arroz e na mistura de arroz + resíduo de cervejaria, apresentaram viabilidade média em torno de 85 % bem próxima aos valores encontrados no Malte A (90,04 %) e B (93,17 %) e fibra de algaroba (98,21 %). Resultados similares também foram achados por Oliveira et al. (2008) que verificaram que a viabilidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar + antibiótico sulfato de

estreptomicina e óleo Nujol esteve acima de 95 % e que apresentaram atividade patogênica sobre os insetos nos diferentes parâmetros avaliados sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis*.

Avaliação da patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre o cupim do coqueiro

Os conídios de *B. bassiana* produzidos no arroz polido, malte A, malte B, fibra de algaroba, bagaço da cana-de-açúcar, sementes e a fibras da acerola mostrou efeito letal na concentração testada (10^6 conídios.mL⁻¹). Os resultados obtidos evidenciaram mortalidade dos cupins às 72 horas após a infecção com conídios produzidos em todos os substratos. Após 96 horas da infecção, foram observadas hifas escassas projetando-se da superfície da cutícula dos cupins. A partir das 120 horas de infecção, foi observado a mumificação e o rompimento da cutícula do inseto, com exceção do grupo controle (**Figura 3**).

Figura 03: Infecção do cupim com *Beauveria bassiana*. Bioensaio realizado em água destilada autoclavada. Mumificação do inseto após 120 horas de infecção. Conídios produzidos na fibra de algaroba (A), malte A (B), malte B (C), semente de acerola (D) e bagaço de cana-de açúcar (E). Controle negativo – após 120 horas (F).



Fonte: (PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016)

Verificou-se que nos estágios iniciais, a infecção causou alterações fisiológicas como a diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia. Esses dados confirmam os resultados obtidos por Vey et al. (2002), onde os hospedeiros infectados [carrapato *Ixodes ricinus* (L.)] exibiam os primeiros sinais de colonização, que são: inquietação, perda de coordenação motora, parada de ingestão de alimentos e morte.

Os distúrbios fisiológicos gerados nos hospedeiros, provavelmente foram provocados pela produção de micotoxinas. As dextruxinas, metabólitos secundários produzidos pelos fungos, são as principais toxinas que afetam os canais de transportes de íons, envolvidos nas respostas musculares e na integridade das membranas celulares. Portanto, estes fatores apontam que as micotoxinas estão envolvidas na sintomatologia exibida nos primeiros estágios de infecção (SHAH; PELL, 2003).

A ação das micotoxinas produzidas por *B. bassiana* sob o cupim do coqueiro foi considerada aguda, devido à eliminação por completo e rapidamente do controle nervoso sobre as funções do corpo do inseto. Resultados semelhantes foram observados em saúvas (*Atta* sp.) e moscas domésticas infectadas com *B. bassiana*, onde foi observado diminuição momentânea dos movimentos (ALVES, 1998a). As micotoxinas também causaram paralisia progressiva em larvas de coleópteros e cupins infectadas com *M. anisopliae* (BUENO, 2010).

A taxa de mortalidade dos cupins após infecção com os conídios produzidos nos diferentes substratos não diferiram estatisticamente superando 80 % de mortalidade (**Tabela 5**), com exceção do grupo controle. A virulência de *B. bassiana* não foi afetada devido ao seu crescimento nos diferentes substratos brutos após 10 dias de cultivo, sem nenhum suplemento nutricional. A capacidade de infecção, ocasionada inicialmente pela germinação dos conídios na

cutícula do inseto, pode estar associada a fatores como patogenicidade (dimensões dos conídios, taxa de crescimento e atividades enzimáticas), virulência, especificidade e tolerância do hospedeiro (VARGAS et al., 2003).

Tabela 05: Atividade patogênica de *Beauveria bassiana* produzido em diferentes substratos sobre o cupim adulto do coqueiro em condições de laboratório na concentração de 10^6 conídios ml^{-1} . Período de incubação - 10 dias.

Substratos	Taxa de mortalidade confirmada (%) ($\pm$ EP) ³
Arroz	91,6 $\pm$ 23,60
Malte A	83,4 $\pm$ 11,02
Malte B	87,9 $\pm$ 13,50
Fibra de Algaroba	89,9 $\pm$ 10,98
Bagaço da cana-de-açúcar	93,02 $\pm$ 12,90
Semente de acerola	90,04 $\pm$ 9,56
Controle	1,22 $\pm$ 0,10
CV%	11,8

Os cupins infectados foram colocados em placa de *Petri* contendo papel toalha umedecido com água destilada autoclavada e mantidos em temperatura ambiente ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Diante dos dados obtidos, notou-se que *B. bassiana* não depende de um meio externo bastante nutritivo para dar início ao processo de infecção, visto que o tratamento contendo papel toalha umedecido, mesmo sendo ausente em nutrientes, garantiu a germinação dos conídios e crescimento na cutícula do cupim. A maioria dos fungos entomopatogênicos requer, pelo menos, 95 % de umidade relativa na superfície do hospedeiro para iniciar o processo de germinação, extensão do tubo germinativo e infecção. A alta umidade relativa e a temperatura adequada são condições favoráveis para o crescimento do fungo e a ocorrência da doença, sendo que

temperaturas altas e baixas retardam o crescimento e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença (HALLSWORTH; MAGAN, 1999).

A patogenicidade da *B. bassiana* não está relacionada ao meio onde o conídio foi produzido, mas sim na concentração da suspensão de conídios, especificidade com o hospedeiro e fatores abióticos.

Os conídios de *B. bassiana* são envolvidos por uma substância transparente, mucilagínosa e aparentemente viscosa que, além de proteger contra a dessecação, facilita a adesão desses conídios à superfície do inseto. O muco que envolve os conídios possui altos níveis de aminopeptidases, que podem criar condições favoráveis para a atuação das enzimas extracelulares e garantir o processo de germinação e colonização do fungo sob a cutícula do inseto (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Além disso, podemos destacar a ação de enzimas envolvidas na patogenicidade do fungo *B. bassiana*. As proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* desempenham um papel crucial na hidrólise da cutícula para penetração do fungo através do exoesqueleto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990). Uma vez na hemocela, o fungo poderá produzir metabólitos tóxicos capazes de causar paralisias (DRESNER, 1950), atuar nos hemócitos (MAZET et al., 1994), destruir o balanço fisiológico normal do sistema hospedeiro (SHARMA et al., 1994; STÜRMER et al., 2003).

A penetração do fungo através do tegumento ocorre, em parte, pela ação de enzimas degradadoras de cutícula. St Leger et al. (1986a, c) atestaram que as enzimas extracelulares foram produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando crescidos em cutícula do gafanhoto (*Schistocerca gregaria*). Uma protease purificada de *M. anisopliae* foi

capaz de retirar 25-30 % das proteínas cuticulares, sugerindo a atuação das proteases na hidrólise da cutícula, facilitando assim a penetração da hifa.

Observou-se também que entre os genes expressados durante o processo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro, está o gene *pr1A* que codifica uma protease do tipo subtilisina (*PR1A*), e tem uma atuação efetiva na penetração da cutícula do hospedeiro pelo fungo (St. LEGER et al.,1992).

Agradecimentos

Ao Departamento de Micologia (Micoteca URM) da Universidade Federal de Pernambuco pela doação da linhagem fúngica, e ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba por ceder à estrutura física para realização de parte deste trabalho.

Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4a ed. New York: Journal Wiley, p. 880, 1996.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole, p.73-126, 1986b.

ALVES, S. B. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.27, p.77-86, 1992.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998a.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Malone Ltda, Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998b.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 414 p,2008.

BIDOCHKA, M. J.; KACHATOURIANS, G. G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. v.56, p.362-370, 1990.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Bon, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado, Rio de Janeiro. Ed. Interciência p,241-271,2008.

BUENO, V. P. Controle biológico na região Sudeste. Revista G. Bio, v.1, p.4- 6, 2010.

CRUZ, B, C, C. Caracterização físico-química e composição química do semimembranosus e *Tríceps brachii* de Cordeiros Dorper X Santa Inês alimentados com diferentes componentes da Algaroba. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia Itapetinga-BA.110p. 2015.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. Applied Microbiology and Biotechnology, v.33, p.712-715, 1990.

DRESNER, E. The toxic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on insects. Journal of the New York Entomology Society, Lawrence, Kan, v. 58, p. 269- 278. 1950.

EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Biological Sciences, Bombay, v.6, p.269-274, 2006.

FERREIRA, D. F. (Ed.). Sisvar: versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA, 2003.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, v.74, p.261-266, 1999.

IBRAHIM, Y. B.; LOW, W. Potencial of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. International Journal of Pest Management, v.39, p.288-292, 1993.

JENKINS, N. E.; HEVIOFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information, v.31, p.21-31, 1998.

KUMAR, A.; SING, R. A. Differential response of *Pyricularia grisea* isolates from rice, finger millet and pearl millet to media, temperature, pH and light. Indian Journal Mycological Plant Pathol, v.25, p.238- 43, 1995.

LOPES, I. C. Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja. Dissertação de mestrado Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 58f. 2016.

LOUSADA JÚNIOR, J. E; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; E RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. Revista Ciência Agronômica, v.37, p.70-76, 2006.

MAZET, I.; HUANG, S.Y.; BOUCIAS, D. G. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. Experientia, Basel, v.50, p.142-147, 1994.

NELSON, T. L.; LOW, L.; GLARE, T. R. Large scale production of New Zealand strain of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium sp.* In: Conference Proceeding. The New Zealand Plant Protection Society Incorporated: New Zealand Plant Protection Society. v.49, p.257-261, 1996.

NEVES, P. M. O. J. ; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) Neotrop. Entomol. v.34, p.77-88, 2005.

OLIVEIRA, M. A. P.; MARQUES, E. J.; TEXEIRA, V. W; BARROS, R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) Acta Sci. Biol. Sci. Maringá, v.30, p.220-224, 2008.

PEREZSENDIN, M. L. A.; GONZALES BARRIOS, J. Biological aspects of *Pyricularia oryzae* in Cuba. Ciencias de la Agric., v.2, p.111-3, 1982.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 180p, 2007.

ROBL, D.; SUNG, L. B.; NOVAKOVICH, J. H.; MARANGONI, P. R. D.; ZAWADNEAK, M. A. C.; DALZOTO, P. R.; GABARDO, J.; PIMENTEL, I. C. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues Brazilian Journal of Microbiology, v.40, p.296-300, 2009.

SENE, L.; ALVES, L. F. A.; LOBRIGATTE, M. F. P.; THOMAZONI, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.7, p.449-456, 2010.

SILVA, C. G.; MATA, M. E. R. M. C.; BRAGA, M. E. D.; QUEIROZ, V. S. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.5, p.51-56, 2003.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.61, p.413-423, 2003.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P.; TAJAK, R. C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, v.32, p.168-171, 1994.

STURMER, A. T.; LUANGSA-ARD, J. J.; ROBERTS, D. W. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Científica, Ciências Biológicas. Saúde*, 5/6, p.85-88, 2003.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.167-177, 1986a.

ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.48, p.85-95, 1986c.

ST. LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning e and regulatory analisys of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* v.204, p.991-1001, 1992.

STÜRMER, A. T. et al. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v.5/6, p.85-88, 2003/2004.

VARGAS, L. R. R.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, R. T. T.; BARROS, N. M. Caracterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, p.13-18, 2003.

VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the mycotoxin e on insect haemocytes ando n dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.80, p.177-187, 2002.

WEBSTER, R. Y.; GUNNELL, P. S. Compendium of rice diseases. *American Phytopathological Society*, p.7-14, 1992.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v.40, p.36-40, 1982.

CAPÍTULO II

Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em diferentes substratos através da fermentação em estado sólido

Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães¹ • Kristerson Reinaldo de Luna Freire²•

Sharline Florentino de Melo Santos³ • Adna Cristina Barbosa de Sousa^{1,2} • Andréa Farias de Almeida⁴

¹Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-Mestrado

²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular

³Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

⁴Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia

O trabalho será submetido à Revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering

Resumo

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin é um fungo entomopatogênio que produz enzimas hidrolíticas que estão diretamente envolvidas no processo de patogenicidade. Entretanto, ao ser estimulado por substratos específicos pode produzir enzimas de interesse biotecnológico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de utilização de diferentes substratos (bagaço da algaroba, resíduos de malte, sementes de acerola e bagaço da cana-de-açúcar) através de processo fermentativo em estado sólido para produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Os substratos analisados foram submetidos à ação metabólica de *B. bassiana* em cultivo sólido e verificados quanto a sua habilidade de produzir enzimas proteolíticas, amilolíticas e celulolíticas. A atividade enzimática (celulolítica, amilolítica) foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico). Os substratos utilizados na fermentação em estado sólido, malte A ($1,178 \pm 0,002$ U/mL), malte B ($2,392 \pm 0,013$ U/mL), fibra algaroba ($0,596 \pm 0,007$ U/mL) e semente de acerola ($0,964 \pm 0,09$ U/mL) apresentaram atividade amilolítica. A partir dessa análise, diferentes temperaturas foram avaliadas (30°, 40°, 50°, 60°, 65° e 70° C) para identificar a temperatura ótima das enzimas amilolíticas produzidas nesse processo. Observou-se que as maiores atividades encontradas foram em temperaturas extremas, na faixa de 60° a 70° C, sugerindo que essas enzimas são termofílicas. O bagaço de cana de açúcar apresentou maior atividade celulolítica ($15,29 \pm 0,07$ U/mL) para endoglucanase (CMcase) e ($2,58 \pm 0,9$ U/mL) para exoglucanase (FPase) devido à característica de sua matriz celulósica, que difere dos demais substratos. A atividade das proteases foi quantificada utilizando como substrato a azocaseína. A algaroba apresentou a maior atividade ($0,514 \pm 0,009$ U/mL). Todos os substratos exibiram atividade proteolítica ao final do processo, proporcionando um enriquecimento proteico para cada um desses substratos utilizados no processo. Os substratos utilizados para crescimento de *B. bassiana* demonstraram potencial para a produção de enzimas hidrolíticas para fins biotecnológicos.

Palavras chave: substratos naturais, fungo filamentoso, enzimas extracelulares, fermentação

Introdução

As enzimas são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido (produção de xaropes), ração animal, indústria química e farmacêutica (BARATTO et al., 2011).

Nos últimos anos, a perspectiva da utilização de processos fermentativos em estado sólido tem aumentado para produção de enzimas de interesse industrial. Tal processo é caracterizado pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos e porosos, na ausência de água livre entre as partículas da matriz sólida. A fermentação em estado sólido (FES) usando substratos facilmente disponíveis e de baixo custo vem sendo empregada, predominantemente, em países orientais, para a obtenção de produtos de importância comercial (GUTIERREZ-ROJAS; TORRES, 1992). Tendo em vista esses aspectos, os estudos básicos de avaliação e seleção de novos substratos, principalmente subprodutos e resíduos agroindustriais, além de propriedades nutricionais importantes, possuem grande disponibilidade e baixo custo. Esses substratos podem contribuir para a produção animal e para minimizar os danos ecotóxicos.

A FES é vantajosa, pois além de simular o *habitat* natural de micro-organismos (principalmente fungos filamentosos), apresenta maior produtividade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas (RODRIGUES-ZÚNIGA et al., 2011). Os fungos filamentosos são amplamente utilizados para produção de enzimas devido à sua facilidade de cultivo, produzem enzimas extracelulares não necessitando da ruptura celular para sua liberação. Dentre os fungos filamentosos, alguns entomopatogênicos amplamente estudados se destacam

na produção de enzimas hidrolíticas como é o caso dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (POLIZELI et al., 2005, GUIMARÃES et al., 2006).

B. bassiana também é considerado um excelente agente de biocontrole de insetos-praga. Sabe-se que sua capacidade de virulência está pautada na produção de enzimas extracelulares como proteases e quitinases, e pouco é observado na literatura sobre a sua utilização para produção de outras enzimas de interesse industrial. Levando em consideração a importância biotecnológica das enzimas hidrolíticas extracelulares, o presente estudo teve como objetivo verificar o potencial de produção e estabilidade térmica das enzimas hidrolíticas obtidas por *B. bassiana* em diferentes substratos através da fermentação em estado sólido.

Material e Métodos

Linhagem fúngica: foi utilizada uma linhagem de *B. bassiana* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (**Tabela 1**).

Tabela 01: Origem da linhagem de *Beauveria bassiana*.

<i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin	
Nº. do acesso	•URM 2915
Substrato	<i>Nezara viridula</i>
Origem geográfica	*CENARGEM/PR
Ano de registro	1987

•URM - University Recife Mycologia; *CENARGEM - Centro Nacional Agropecuário de Recursos Genéticos.

Origens dos substratos: foram utilizados cinco substratos especificados na **Tabela 2**.

Tabela 02: Origens dos substratos.

Substrato	Origem
Arroz polido (substrato padrão)	Produto comercializado
Resíduos de malte A e B	Laboratório de Química Orgânica Aplicada CBiotec - UFPB (João Pessoa - PB)
Bagaço da cana-de-açúcar	Barraca de caldo-de-cana (João Pessoa - PB)
Acerola – sementes	Indústria Polpas de Frutas Ideal (João Pessoa - PB)
Algaroba – fibras	Cidade Japi/RN (Região do Semiárido)

Dentre os substratos citados na **Tabela 2**, destacam-se os resíduos de malte cervejeiro e a fibra de algaroba, pelo ineditismo da utilização desses substratos na produção de enzimas de interesse biotecnológico. Os resíduos de malte cervejeiro foram coletados ao final da etapa de clarificação e lavagem do mosto do processo artesanal da produção cervejeira. O malte B foi coletado quando o mosto originário da etapa de lavagem atingiu a densidade específica de 1,010, enquanto que o malte A foi coletado quando a densidade específica do mosto alcançou 1,005. A

densidade do mosto reflete a concentração de sólidos solúveis nele contido, principalmente de açúcares (fermentescíveis e dextrinas). Já para o substrato algaroba, utilizou-se as suas fibras após um processo de prensagem das vagens. A vagem de algaroba foi prensada em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 kgf/cm^2 , conforme metodologia de Silva et al. (2003). O resíduo fibroso resultante da prensagem dessas vagens (fibra da algaroba) foi utilizado como substrato no processo de fermentação em estado sólido.

Prensagem da algaroba: as vagens de algaroba foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas em uma balança eletrônica (Gural - modelo ESE-15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram sanitizadas imergindo-as em uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos, a remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a $65 \pm 2^\circ \text{C}$, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, as vagens hidratadas foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 Kgf/cm^2 (SILVA et al., 2003).

Meio de manutenção da linhagem fúngica: ágar-Sabouraud-dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 5,6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, e mantidas à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, guardadas sob refrigeração a 4°C .

Caracterização dos substratos

pH: Preparou-se uma suspensão com 100 mL de água e 10 g do substrato. Após homogeneização e precipitação dos sólidos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (mPA210) previamente calibrado com soluções padrões (Instituto Adolf Lutz, 2005).

Teor de açúcares redutores: Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose a 1 g/L. Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração. Foram pesados 30 g dos substratos em frasco *erlenmeyer* de 250 mL, adicionado 100 mL de água destilada. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) a 200rpm durante uma hora. Posteriormente, foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE-0581), em funil *Buchner*, usando papel de filtro qualitativo (14 µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5 mL da solução e adiciono-se 2,5 mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100° C por dez minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3 mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

Determinação das proteínas totais: a determinação das proteínas do extrato enzimático foi realizada pelo Método de Bradford (GODOY, 2009), que dosa proteínas solúveis. Adicionou-se em um microtubo 10 µL de amostra diluída em 790 µL água Milli-Q e 200 µL reagente de

Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, utilizando o espectrofotômetro, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm.

Determinação do aumento proteico: as amostras tiveram como base o valor proteico contido no substrato *in natura*. O aumento proteico (AP) foi definido como a razão entre a diferença do valor proteico do substrato enriquecido e o valor proteico do substrato na forma *in natura*, e o valor inicial de proteína total do substrato *in natura* (ARAÚJO, 2004), conforme equação 1:

$$AP (\%) = \frac{(\%)Proteína\ total\ (substrato\ enriquecido) - (\%)Proteína\ total\ (substrato\ in\ natura)}{(\%)Proteína\ total\ (substrato\ in\ natura)} \quad (1)$$

Produção e atividade das enzimas hidrolíticas

Produção enzimática em fermentação em estado sólido: o experimento foi realizado em frascos *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 30 g de cada substrato com teor de umidade de 70 ± 10 %, sendo preparados em triplicata. Para umidificar os substratos foi utilizada água destilada estéril. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 120° C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL da suspensão de conídios (1×10^6 conídios/mL) e incubado a $29 \pm 1^\circ$ C durante 10 dias (STURMER et al., 2003).

Testes analíticos

Obtenção do extrato enzimático bruto: para o processo fermentativo em estado sólido, a obtenção do extrato enzimático bruto foi realizada pela adição de 100 mL de água destilada em 30 g de amostra de cada frasco, a qual foi submetida à agitação contínua em *shaker* de bancada durante 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração a vácuo, em filtro qualitativo

Whatmann nº 01, para remoção dos sólidos. O sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e a atividade enzimática.

pH dos extratos enzimáticos: Após a obtenção dos extratos enzimáticos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (mPA210) previamente calibrado com soluções padrões (Instituto Adolf Lutz, 2005).

Determinação de proteínas totais: a determinação das proteínas do extrato enzimático foi realizada pelo Método de Bradford (GODOY, 2009), que dosa proteínas solúveis, utilizando como padrão BSA. Adicionou-se ao microtubo 10 µL de amostra diluída em 790 µL água Milli-Q e 200 µL reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e utilizando o espectrofotômetro, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm.

Atividade amilolítica sacarificante: foi determinada utilizando como substrato específico, solução de amido (Método Sacarificante), submetido ao contato com o extrato enzimático bruto para promover a hidrólise pela ação das enzimas e quantificada pelos açúcares redutores produzidos (MILLER, 1959). A partir do extrato bruto foram feitas as determinações de atividade amilolítica inoculando 1,0 mL de extrato enzimático em 1,0 mL de solução de amido 1,0 % em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37° C. Os açúcares redutores foram determinados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi feita em 570 nm usando solução de glicose como padrão (MILLER, 1959). A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 1,0 mL de água destilada substituiu a amostra, seguindo o mesmo procedimento. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de glicose por minuto nas condições do método proposto (ALVA et al., 2007).

Determinação da temperatura ótima e avaliação da termoestabilidade: o efeito da temperatura foi determinado através da atividade enzimática pelo método DNS (MILLER, 1959). A temperatura ótima para as enzimas amilolíticas foi determinada incubando-se 1,0 mL do extrato enzimático em 1,0 mL de solução de amido 1,0 % em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0. A atividade amilolítica foi realizada incubando as amostras nas temperaturas de 30°, 40°, 50°, 65° e 70° C (CARVALHO et al., 2008). Na avaliação da termoestabilidade das enzimas, os ensaios foram realizados na temperatura onde foi determinada a maior atividade enzimática, previamente determinados. Durante uma hora, em intervalos pré-definidos a reação foi interrompida com a adição de DNS e procedida à análise.

Determinação da atividade celulolítica: (Fpase) - o método consiste em encontrar uma diluição do extrato enzimático que libere diferentes concentrações de glicose na reação (GHOSE, 1987). Foram preparadas, utilizando tampão citrato de sódio 0,05 M com pH 4,8, quatro diluições diferentes do extrato bruto enzimático: 1:40, 1:80, 1:100 e 1:160. Uma curva de calibração foi preparada a partir de quatro tubos de ensaio contendo 1,0 mL de tampão e 0,5 mL de solução padrão de glicose (6,7 mg/mL, 5 mg/mL, 3,3 mg/mL e 2,0 mg/mL).

Tubos de reação foram preparados adicionando 1,0 mL de tampão, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1,1 x 6,0 cm (50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático diluído. Para o branco da enzima, foram adicionados em diferentes tubos de ensaio 1,0 mL de tampão e 0,5 mL das respectivas diluições. Um tubo de ensaio foi preparado com 1,5 mL de tampão e uma fita de papel de filtro, como branco do substrato.

Como zero do espectrofotômetro, um tubo com 1,5 mL de tampão foi preparado. Em seguida, os tubos, reacionais, padrões, brancos e zero do espectrofotômetro, foram incubados em banho-maria a 50° C, por 60 minutos. Passado o tempo de reação, foram adicionados 3,0 mL do

reagente DNS. Todos os tubos foram aquecidos por 5 minutos, resfriados em água gelada e adicionados 20 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm.

CMcase: Os tubos de reação foram preparados adicionando o substrato específico(carboximetilcelulose cmc 2%), 0,5 mL do tampão citrato e 0,5 mL do extrato enzimático bruto em seguida incubado a 50°C por 10 minutos. Como zero do espectrofotômetro, um tubo com 1,5 mL de tampão foi preparado. Os tubos, reacionais, padrões, brancos e zero do espectrofotômetro, foram incubados em banho-maria a 50° C, por 60 minutos. Passado o tempo de reação, foram adicionados 3,0 mL do reagente DNS. Todos os tubos foram aquecidos por 5 minutos, resfriados em água gelada e adicionados 20 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm.

Atividade proteolítica: a atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, foi adicionado 100 µL do extrato do sobrenadante a 100 µL do tampão tris 0,1 M pH 9. Em seguida, foi adicionado 100 µL do substrato (azocaseína 10 mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 37° C por 30 minutos. A reação foi interrompida e adicionado 500 µL de ácido tricloacético (TCA) 10 %. Após a centrifugação 10.000 g por 5 minutos, foi adicionado 200 µL de NaOH 1,8N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 429 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do sobrenadante (GIONGO, 2006).

Resultados e Discussão

Caracterização dos substratos

A caracterização dos substratos e resíduos coletados, utilizados no processo de produção de enzimas, por fermentação em estado sólido, está apresentada na **Tabela 3**.

A produção das enzimas amilases, celulasas e proteases foi induzida pela presença de nutrientes no substrato. Assim, a caracterização dos substratos visou conhecer a composição dos resíduos com relação ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese enzimática.

Tabela 03: Caracterização dos substratos

Parâmetros Substratos	pH	Açúcares redutores (g.100 mL⁻¹)	Proteína total (g.100 mL⁻¹)
Malte A	5,18	0,4116 ± 0,18	0,0107 ± 0,9
Malte B	4,66	0,1264 ± 0,20	0,0114 ± 0,31
Bagaço de cana-de-açúcar	6,14	0,2066 ± 0,18	0,0107 ± 0,32
Fibra de Algaroba	5,90	0,0345 ± 0,19	0,0110 ± 0,33
Semente de acerola	3,21	0,3990 ± 0,18	0,0132 ± 0,33

No resíduo úmido de malte cervejeiro (malte A e B) os valores de pH encontrados foram de 5,18 e 4,66, respectivamente, caracterizando o resíduo cervejeiro como ácido. Resultados semelhantes foram encontrados por Mello (2014).

O teor de açúcares redutores totais obtido para o bagaço de malte A e B (0,4116 ± 0,18 g.100 mL⁻¹ e 0,1264 ± 0,20 g.100 mL⁻¹, respectivamente) também atesta com os dados da literatura que mostram o bagaço de malte como material predominantemente fibroso (ALIYU; BALA, 2011, MUSSATO et al., 2006; LIMA, 2010; ROBERTSON et al., 2010) e ainda contêm açúcares

fermentáveis. Apesar da lavagem até a exaustão deste resíduo para recuperação de extrato no mosto cervejeiro, ainda apresentou quantidades de açúcares redutores (MATHIAS, 2014).

Em relação ao teor de proteínas totais, os baixos valores encontrados para o resíduo de malte podem ser justificados pelo esgotamento de toda sua fração solúvel durante a passagem da denominada água secundária ou de lavagem (MATHIAS, 2014).

Já o bagaço de cana-de açúcar, pode-se observar um pH de 6,14, mais próximo da neutralidade e um teor de açúcares redutores de $0,2066 \pm 0,18 \text{ g.100 mL}^{-1}$.

A fibra de algaroba apresentou um pH de 5,9, uma concentração de açúcares redutores de $0,0345 \pm 0,19 \text{ g.100 mL}^{-1}$ e $0,0110 \pm 0,33 \text{ g.100 mL}^{-1}$ de proteínas totais. Esses resultados foram obtidos no substrato *in natura*, diferindo com os citados por Silva et al. (2007), onde foi encontrado na farinha de algaroba $4,6 \text{ g.100 g}^{-1}$ de açúcares redutores e o teor de proteínas encontrado foi de $9,0 \text{ g.100 g}^{-1}$. Resultado este inferior ao detectado por Holmquist-Donquis e Rey (1997) com $14,56 \text{ g.100 g}^{-1}$ de proteínas. Essas diferenças observadas podem ser justificadas pela composição química variável, que está na dependência do meio onde é produzida (MENDES, 1982).

De acordo com os valores de pH apresentados na **Tabela 3** para semente de acerola, o pH foi de 3,21, estando coerente com valores anteriormente encontrados na literatura, cujo o perfil de pH da acerola pode variar de 2,58 a 3,91 (GONZAGA NETO et al., 1999; GOMES et al., 2000; AGUIAR, 2001; PIMENTEL et al., 2001). O pH é um parâmetro de baixa variabilidade na fruta acerola (LIMA et al., 2002a).

Também foi observado para semente de acerola $0,3990 \pm 0,18 \text{ g. 100 mL}^{-1}$ de açúcar redutor, e $0,0132 \pm 0,33 \text{ g. 100 mL}^{-1}$ de proteína total. Já Vendramini e Trugo (2000) encontram $4,4 \text{ g. 100 g}^{-1}$ de açúcares redutores e $0,9 \text{ g. 100 g}^{-1}$ de proteínas totais na fruta *in natura*. Vale

destacar que diferenças observadas podem ser fundamentadas pelo processamento sofrido na fruta *in natura*. Tanto a semente quanto a fibra de acerola utilizadas nesse trabalho foram oriundas do beneficiamento da fruta para fabricação de polpas. Portanto, o conteúdo de açúcares e proteico da fruta foi extraído no processamento, por isso a quantidade de açúcar redutor e proteínas é bem escassa no início do cultivo.

Produção de enzimas hidrolíticas através da fermentação em estado sólido

Todos os substratos citados na **Tabela 1** foram verificados quanto à produção de enzimas amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas. Através das análises de atividade enzimática, ao final do processo, foram analisados em termos de potencial de produção de enzimas, baseado na fermentação em estado sólido. Todas as enzimas hidrolíticas (amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas) foram baseadas nas características dos substratos escolhidos para o processo.

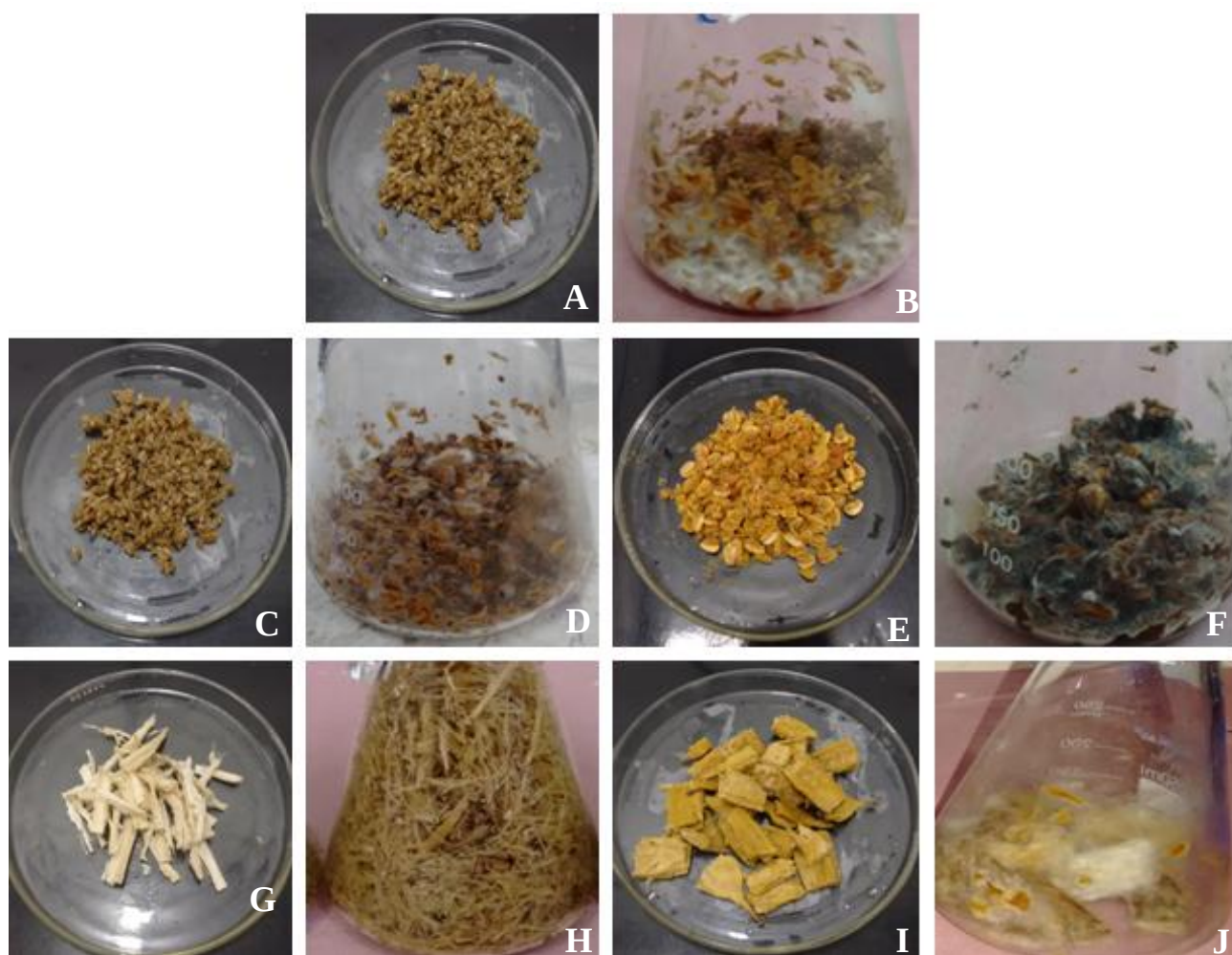
Foi possível notar a diferença entre os resultados nos diferentes resíduos, o que demonstra que nem todos os substratos possuem o mesmo potencial para a produção de diferentes enzimas.

Produção das enzimas amilolíticas

A produção enzimática foi analisada durante o processo de fermentação em estado sólido utilizando substratos malte cervejeiro, fibra de algaroba, semente de acerola e bagaço de cana-de-açúcar, com umidade 70 % (± 10) durante 10 dias de cultivo ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$).

No decorrer das 240 horas de cultivo, pode-se observar alterações visíveis nos substratos, como o notável desenvolvimento e crescimento micelial do fungo apresentado por uma camada pulverulenta de coloração branca sobre os substratos (**Figura 1**). Os fungos constituem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, na sua fase vegetativa ou micelial de desenvolvimento do fungo (WISNIEWSKI et al., 2010).

Figura 01: Substratos antes e depois da Fermentação em estado sólido através da colonização de *Beauveria bassiana* malte B (A e B), malte A (C e D), semente de acerola (E e F), bagaço de cana-de-açúcar (G e H) e fibra de algaroba (I e J).



Fonte: (PAIVA-GUIMARÃES A. G. L. 2016)

Tabela 04: Valores de pH antes e após 240 horas do cultivo.

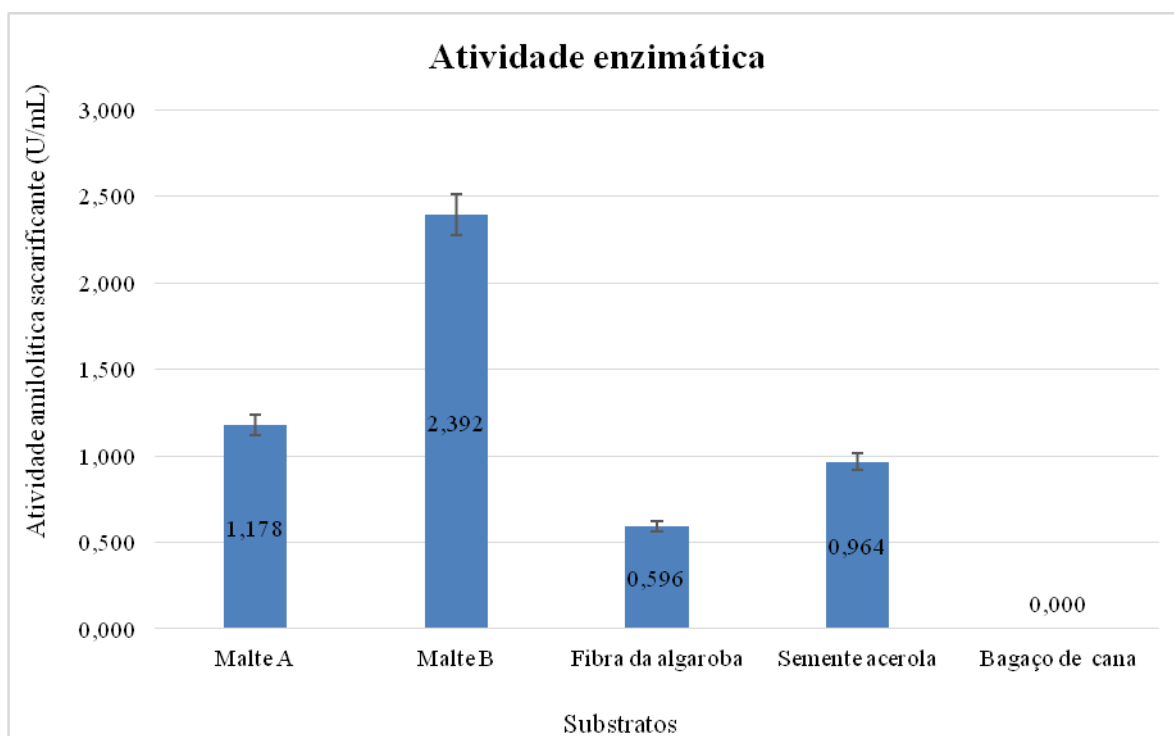
Substrato	pH antes	pH após
Malte A	5,18	6,53
Malte B	4,66	6,47
Fibra de Algaroba	5,90	6,60
Bagaço de cana-de açúcar	6,14	6,50
Semente de acerola	3,21	4,93

Os extratos brutos enzimáticos originados da fermentação em estado sólido foram analisados quanto ao pH. Ao final das 240 horas da fermentação, pode-se observar uma variação no pH entre 4,93 a 6,60 (**Tabela 4**) no extrato bruto enzimático. Esse parâmetro indica a produção de metabólitos pela ação de *B. bassiana* ao longo do processo de fermentação, podendo ser associado com a produção de enzimas.

Os extratos brutos também foram avaliados quanto à sua atividade amilolíticas, através da análise da atividade amilolítica sacarificante. Pode-se observar que dos cinco substratos utilizados (malte A, malte B, fibra de algaroba, semente de acerola e bagaço de cana-de-açúcar), quatro deles (malte A, malte B, fibra de algaroba, semente de acerola) apresentaram atividade (**Figura 2**). Apenas um substrato (bagaço de cana-de açúcar) não exibiu atividade amilolítica, por ser constituído basicamente de material lignocelulósico, tendo como componentes principais celulose, fibras e ligninas (PEREIRA et al., 2001), sendo constituído por aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY et al., 2000). Deste modo, o bagaço de cana foi descartado para as análises subsequentes com relação às enzimas amilolíticas desse processo.

A fibra de algaroba e semente de acerola revelaram uma atividade enzimática de $0,596 \pm 0,007$ e $0,964 \pm 0,09$ U/mL, respectivamente. Até o momento, não há relatos na literatura que descrevam a utilização da fibra da algaroba e semente de acerola sem qualquer pré-tratamento ou suplementação para produção de enzimas e, portanto, configurando o ineditismo desse trabalho. Deste modo, não há fontes para comparação dos resultados observados neste trabalho.

Figura 02: Atividade amilolítica do cultivo de *Beauveria bassiana* em diferentes substratos.



Os substratos que apresentaram maior potencial para produção de enzimas amilolíticas pelo micro-organismo foram os resíduos de cervejaria malte A e B. Entretanto, o malte coletado quando a densidade específica do mosto no final da etapa de recirculação/lavagem foi de 1,010,

denominado aqui como malte B, apresentou uma atividade enzimática de $2,392 \pm 0,013$ U/mL (Figura 2).

O resíduo úmido da produção de cerveja é o bagaço de malte de cevada resultante do processo de mosturação, apresenta teores variáveis de proteínas e fibras suficientes para exibir atividade enzimática. Assim, o resíduo coletado do mosto de maior densidade específica (SG = 1,010) possui maior teor amido (malte B) que o resíduo coletado do mosto de menor densidade específica (SG = 1,005) (malte A), corroborando com os resultados obtidos na atividade enzimática encontrados nesse processo (KLAGENBOECH et al., 2011).

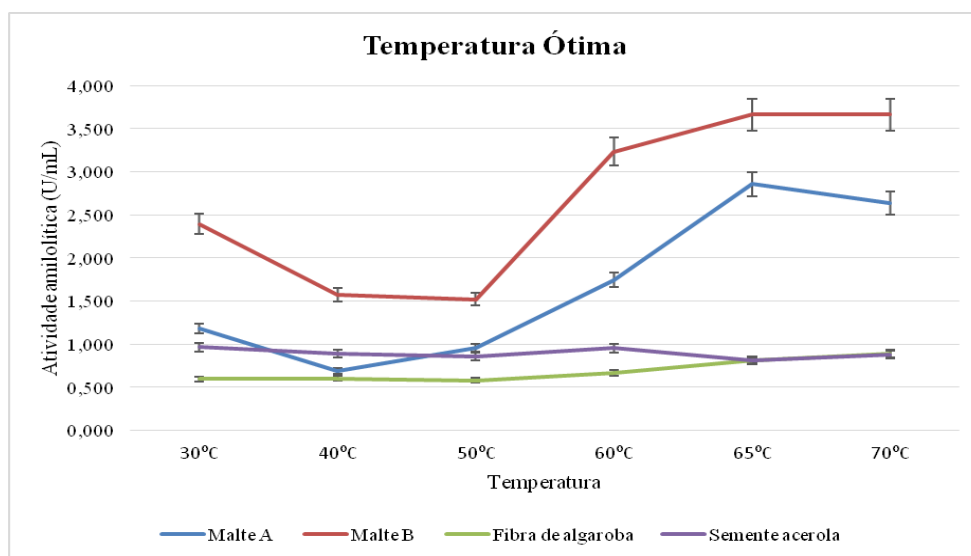
Os valores elevados de atividade enzimática na fermentação do malte B também podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima (Tabela 3), necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Essa baixa disponibilidade estimula o metabolismo microbiano a expressar enzimas necessárias para hidrólise de açúcares simples e mais facilmente assimiláveis (WHITAKER, 1994).

Os resultados encontrados por Stroparo et al. (2012) para quatro linhagens fúngicas, *Penicillium glabrum* J11, *P. herquei*, *P. miczynskii* e *T. viride*, apresentaram atividade amilolítica de 2,34; 2,35; 0,14; 0,21 U/mL, respectivamente. Tais resultados foram semelhantes ao encontrados para *B. bassiana*, neste estudo, o que demonstra sua habilidade de produzir um complexo amilolítico quando induzido pela presença de substrato específico, no caso, rico em amido.

A produção de enzimas é estimulada pelos nutrientes presentes no substrato. O micro-organismo *B. bassiana* utilizado neste estudo é produtor de enzimas que tem função de hidrolisar o amido liberando glicose. Deste modo, é necessário uma fonte de amido para ocorrer a indução da produção de amilases pelo fungo (FELLOWS, 1994; PANDEY et al., 1999; GUPTA et al.,

2003). Assim, o fungo passa a sintetizar as enzimas específicas para degradar determinados substratos em moléculas mais simples obtidas do amido, garantindo a produção enzimática e o crescimento do fungo (SANTANA, 2012).

Figura 03: Análise da temperatura ótima das enzimas amilolíticas produzidas nos substratos malte A, malte B, fibra de algaroba e semente de acerola.



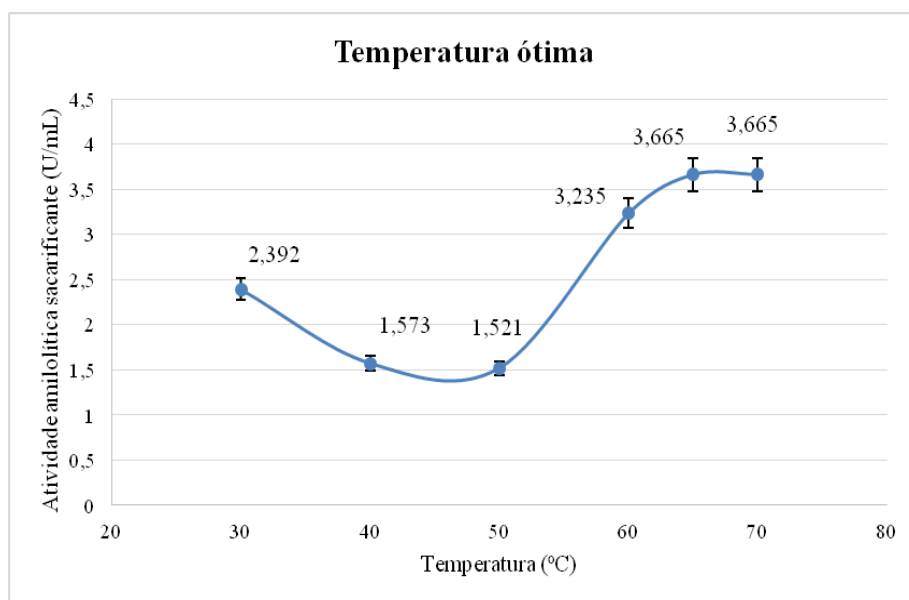
Também foram avaliadas diferentes temperaturas para verificar a temperatura ótima das enzimas amilolíticas produzidas por *B. bassiana* nos substratos analisados (**Figura 3**).

Os resultados revelaram que as enzimas amilolíticas do extrato enzimático bruto, dos quatro tipos de substratos (malte A, malte B, fibra da algaroba e semente de acerola) utilizados na fermentação apresentaram atividade amilolítica nas diferentes temperaturas testadas (30°, 40°, 50°, 60°, 65° e 70° C). Todavia, o substrato malte B apresentou máxima eficiência em relação à atividade das enzimas amilolíticas na faixa de temperatura de 60° a 70°C ($3,665 \pm 0,07$ U/mL), pois apresentam a mesma atividade enzimática demonstrada pelo erro padrão das amostras analisadas nesse intervalo de temperatura.

A consequência da temperatura em uma reação enzimática é observada pelo aumento da velocidade de formação do produto, decorrente da interação entre enzima e substrato. Todavia, existe uma temperatura limite para cada enzima em particular e acima da qual observa-se, gradativamente, a desnaturação da proteína pelo calor. A temperatura em que se observam altos níveis enzimáticos é caracterizada como temperatura ótima (LEHNINGER et al., 1995), bem como, representam o estado em que a molécula exibe uma conformação ideal para sua máxima eficiência catalítica (GONÇALVES, 2006).

A avaliação das enzimas amilolíticas produzidas a partir do malte com maior densidade específica (malte B) permitiu identificar a temperatura ótima de atividade enzimática do extrato bruto obtido do processo fermentativo. A **Figura 4** mostra o perfil das atividades enzimáticas do malte B nas temperaturas avaliadas, sendo as temperaturas de 60° a 70° C consideradas ótima devido a maior atividade enzimática apresentada. Segundo Janssen et al., (1994), a velocidade de uma reação enzimática mediada por uma enzima termofílica dobra, aproximadamente, a cada aumento de 10° C na temperatura. Considerando que a enzima é estável a elevadas temperaturas, a velocidade de reação pode ser aumentada ao se operar a uma temperatura relativamente elevada. Consequentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável das enzimas.

Figura 04: Análise da temperatura ótima para as enzimas amilolíticas produzidas a partir do substrato resíduo de malte B.



Resultados similares foram encontrados por Gonçalves (2006) para as enzimas amilolíticas, glucoamilase e α -amilase, proveniente da fermentação em estado sólido com o fungo *Thermomyces lanuginosus*. A temperatura ótima de atividade foi entre as temperaturas de 60 a 65° C em farelo de trigo suplementado com solução nutritiva.

Negi e Banerjee (2009) caracterizaram a amilase produzida por *Aspergillus awamori* e relatam que esta enzima apresenta temperatura ótima de 70° C. Já Spier (2005) obteve resultado inferior para amilase fúngica, reportando temperatura ótima entre 45° -55° C.

O aumento da atividade enzimática se deve a ativação pela temperatura (SHULER, 1992) na qual os átomos adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Após este período, ocorre a desnaturação ou desativação térmica causada pelo rompimento das fracas interações que mantém unida a estrutura globular da proteína (BAILE; OLLIS, 1986).

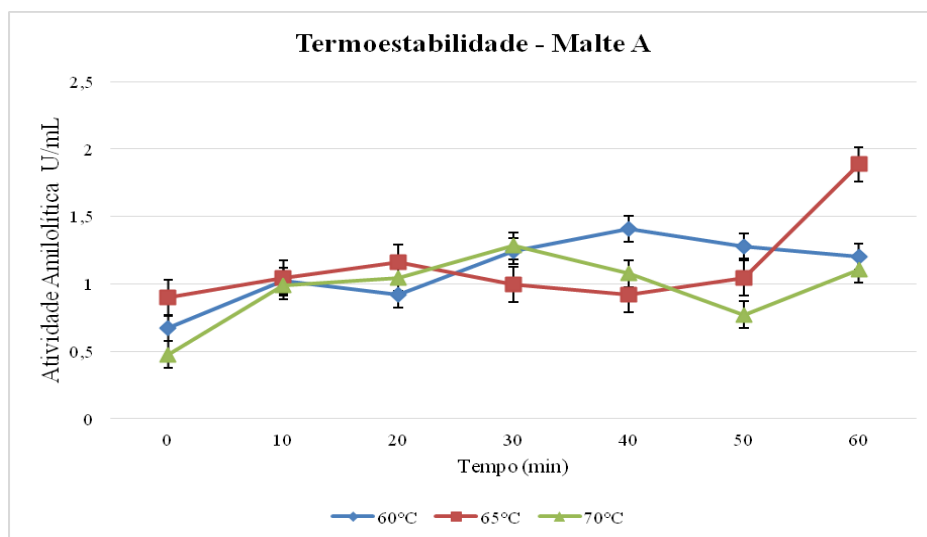
Para análise da termoestabilidade, as enzimas foram incubadas na ausência de substrato

por 1 hora em diferentes temperaturas. Após esse período, observou-se que os extratos enzimáticos obtidos dos quatro substratos utilizados no processo fermentativo apresentaram estabilidade nas temperaturas avaliadas.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade e ação das enzimas é de grande importância para aplicação desta enzima na indústria de alimentos, tendo em vista a necessidade de tratamentos térmicos dos produtos onde é aplicada e a inativação desta enzima após sua utilização (SANTANA, 2012).

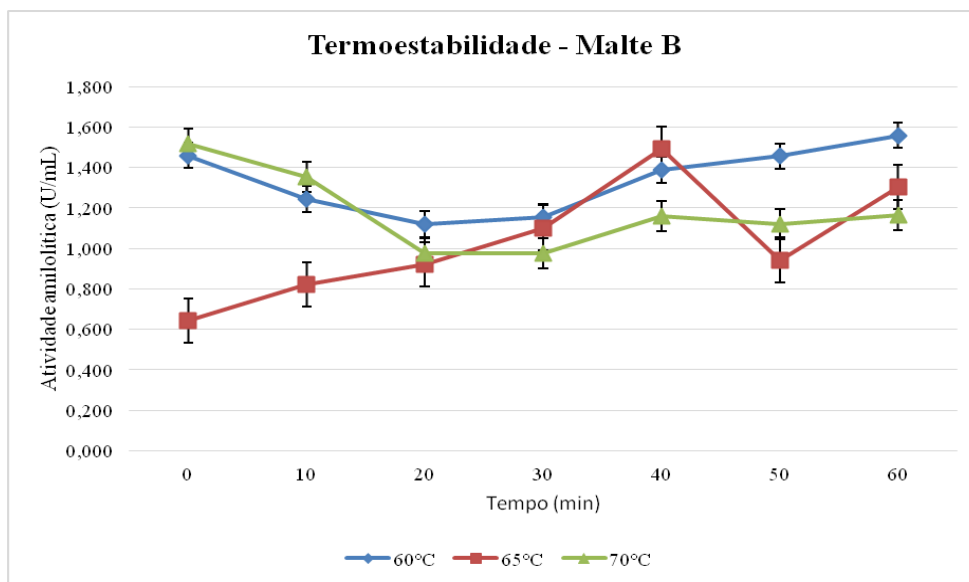
Na **Figura 5** podemos observar que as enzimas produzidas, a partir do substrato malte A, apresentaram estabilidade nas três temperaturas testadas, porém na temperatura de 65° C obteve uma atividade enzimática de $1,887 \pm 0,008$ U/ml ao decorrer de 1 hora de exposição. O perfil apresentado revela termoestabilidade do complexo amilolítico nessa temperatura, que é caracterizado pelas enzimas que possuem a capacidade de permanecer com sua estrutura íntegra em temperaturas acima de 55° C, que geralmente apresentam maior atividade específica e maior estabilidade (YEOMAN et al., 2010).

Figura 05: Análise da termoestabilidade no substrato malte A.

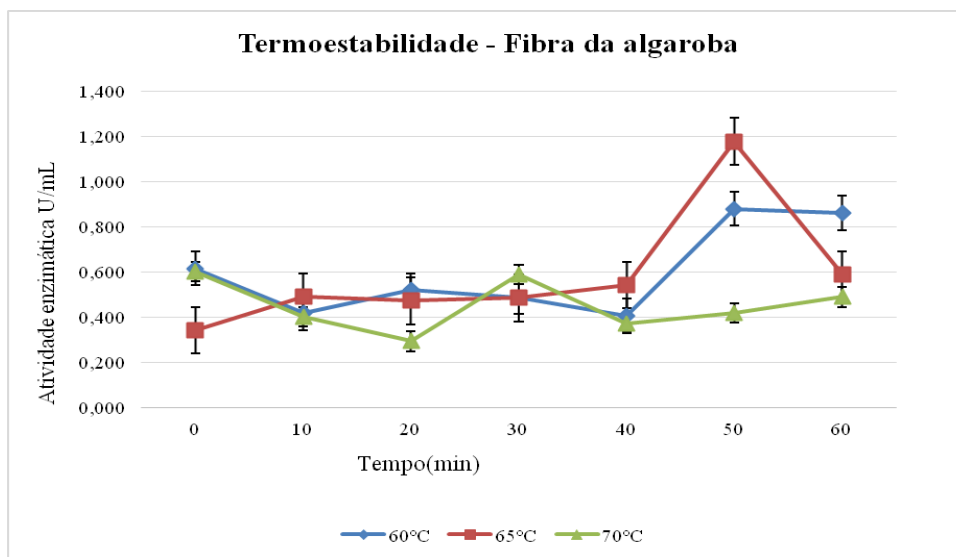


A termestabilidade para o substrato malte B (**Figura 6**) apresentou maior atividade enzimática ao longo do tempo de exposição nas temperaturas 60° a 70° C, com uma atividade enzimática aos 60° C de $1,560 \pm 0,02$ U/ml.

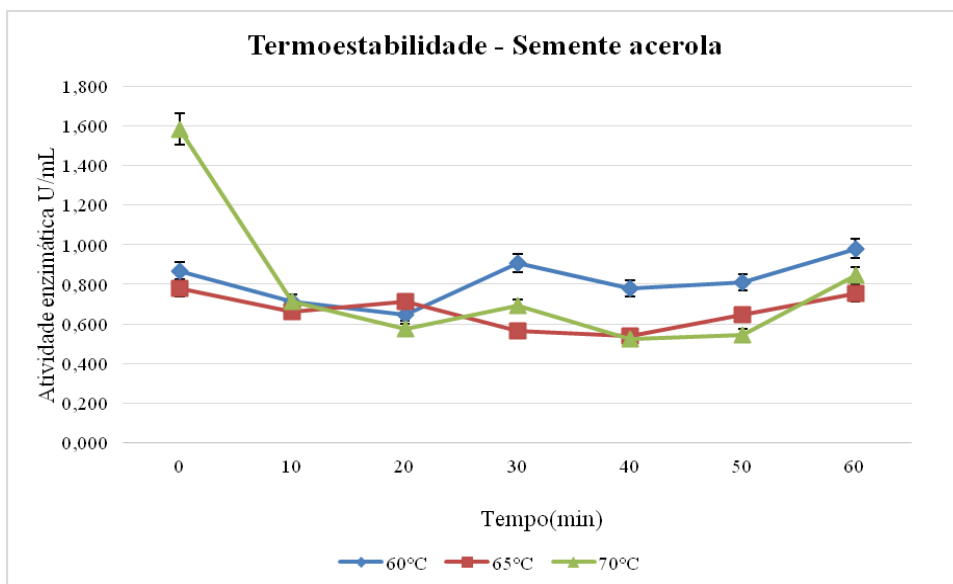
Figura 06: Análise da termoeestabilidade no substrato malte B.



As **Figuras 7 e 8** revelam o perfil de termoeestabilidade da fibra de algaroba e semente de acerola. Nota-se que a fibra de algaroba apresentou o melhor resultado entre as temperaturas de 60° e 65° C, com uma atividade de $1,179 \pm 0,008$ U/mL.

Figura 07: Análise da termoeestabilidade no substrato fibra de algaroba.

Já a semente de acerola (**Figura 8**) manteve sua atividade enzimática ao longo do tempo de exposição nas três temperaturas testadas, atingindo sua maior atividade ($0,980 \pm 0,008$ U/mL) ao decorrer de uma de exposição na temperatura de 60° C.

Figura 08: Análise da termoeestabilidade no substrato semente de acerola.

O aumento na atividade enzimática foi notado no decorrer do tempo de incubação das amostras. Mesmo tendo algumas perdas em alguns períodos de incubação, as atividades enzimáticas se mantiveram ativas durante os 60 minutos, quando submetidas a temperaturas variantes de 60° a 70° C, o que comprova a boa estabilidade térmica da enzima. É possível notar que mesmo a uma temperatura elevada à enzima ainda continuou ativa, não perdendo assim sua termoestabilidade.

Em estudo sobre o aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a produção de amilases fúngicas utilizando os substratos quirera de arroz e de milho e farelo de trigo com suplementação de nitrogênio, foi obtido 5,388 U/mL de atividade enzimática na temperatura de 60° C, 6,200 U/mL a 65° C e 6,511 U/mL a 70° C. Esses resultados são superiores aos obtidos nesse estudo. Entretanto, os subprodutos tiveram uma suplementação de nitrogênio, auxiliando assim o crescimento do micro-organismo (FERREIRA, 2011).

Segundo Negi e Banerjee (2009) as enzimas amilolíticas produzidas por *A. awamori* apresentam temperatura ótima a 70° C.

No trabalho de Farid (2011), as amilases produzidas pelo *Aspergillus oryzae* tendo como substrato o amido solúvel, mostraram um aumento gradual da atividade enzimática com o aumento da temperatura, com atividade máxima em 55° C. Acima de 55° C a atividade começou a declinar. Isso mostra a estabilidade da enzima em condições usadas em processos industriais, o que torna o uso desta enzimas produzidas por micro-organismos ferramentas importantes em processos alimentícios, de limpeza e outras indústrias.

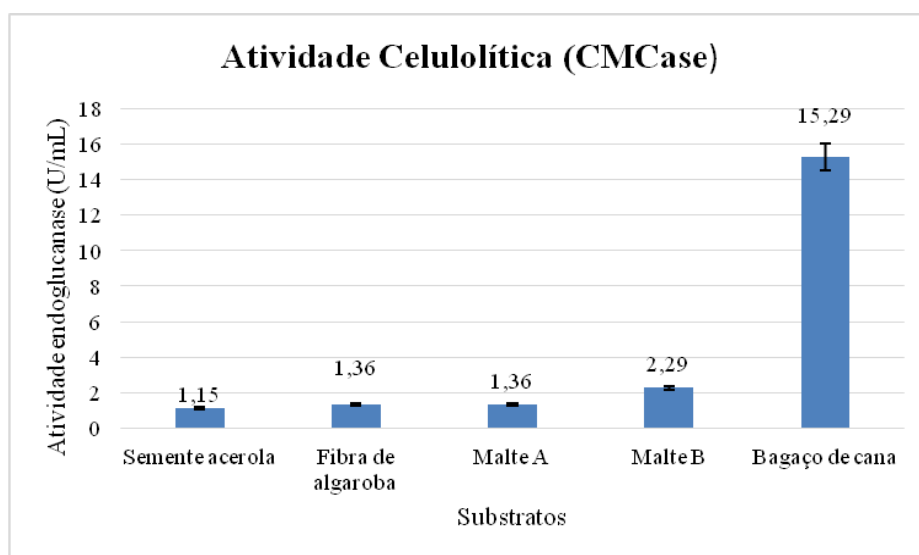
Estes resultados também são interessantes do ponto de vista do potencial de aplicação da enzima, especialmente em processos que requerem altas temperaturas, em torno de 70° C.

Produção de enzimas celulolíticas

A atividade celulolítica foi avaliada em cada substrato utilizado no processo de produção de conídios por *B. bassiana*. Para tanto, foram realizadas análises das enzimas exoglucanases e endoglucanases ao final do processo. As **Figuras 9 e 10** mostram os perfis da atividade celulolítica (CMC_{ase} e FP_{ase}) nos cinco substratos utilizados (fibra da algaroba, resíduo de malte (malte A e malte B), semente de acerola e bagaço de cana-de-açúcar).

Os resultados revelaram que o bagaço de cana-de-açúcar foi o resíduo que apresentou a maior atividade celulolítica em relação aos outros substratos testados, atingindo uma atividade enzimática de $2,58 \pm 0,9 \text{ U/mL}$ (**Figura 10**) da exoglucanase e $15,29 \pm 0,07 \text{ U/mL}$ (**Figura 9**) da endoglucanase após 240 horas de cultivo.

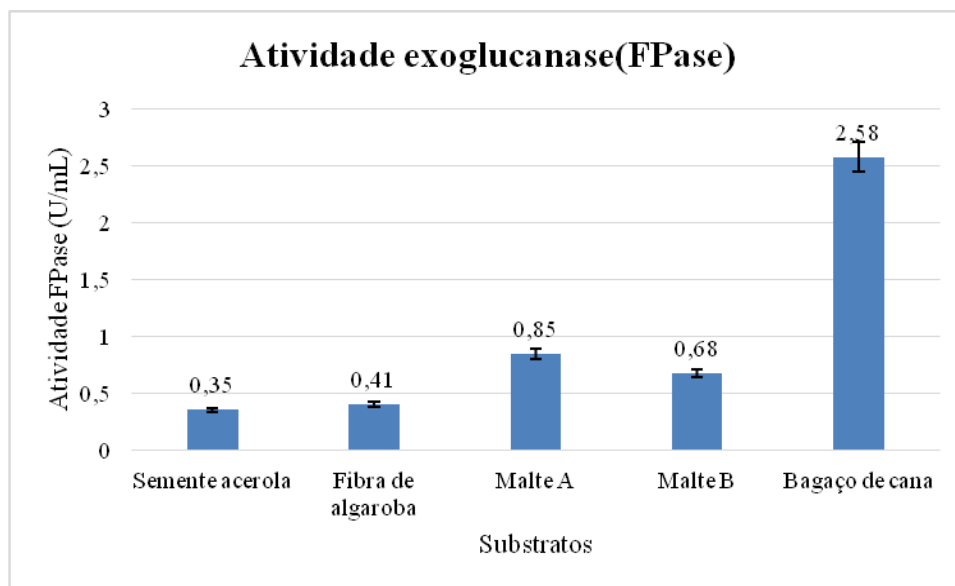
Figura 09: Atividade celulolítica endoglucanase (CMC_{ase}) do cultivo de *Beauveria bassiana* nos substratos analisados.



Resultados inferiores foram obtidos no estudo realizado por Zanchetta (2012) sobre a produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido utilizando misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e cevada e farelo de trigo com fungo *Chaetomium* sp. para a produção de CMC_{ase}. Os maiores valores (9,6 U/mL e 7,3 U/mL) ocorreram às 192 h e 288 h de cultivo, respectivamente.

Já no estudo desenvolvido por Santos et al. (2013), usando *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando resíduos do processamento do cacau, manga e seriguela os maiores valores obtidos para atividade enzimática da endoglucanase foi o resíduo de manga (9,32 U/mL).

Figura 10: Atividade celulolítica exoglucanase (FPase) do cultivo de *Beauveria bassiana* em diferentes substratos.



No estudo desenvolvido por Carvalho et al (2012) utilizando a fermentação em estado sólido em palma doce com *A. niger*, obtiveram uma produção da enzima FP_{ase} de 7,03 U/mL. Tal estudo alcançou uma produção com valores inferiores ao encontrados nesse estudo.

A alta atividade celulolítica de endoglucanases e exoglucanases no bagaço de cana-de-açúcar é justificada devido à característica desse substrato, quando observamos os componentes encontrados na parede celular das células vegetais, que são ricas em polissacarídeos como a celulose e a hemicelulose, e também está contida nessa massa orgânica a lignina. Esses três materiais juntos compõem mais de 75 % da biomassa vegetal (SOARES, 2012).

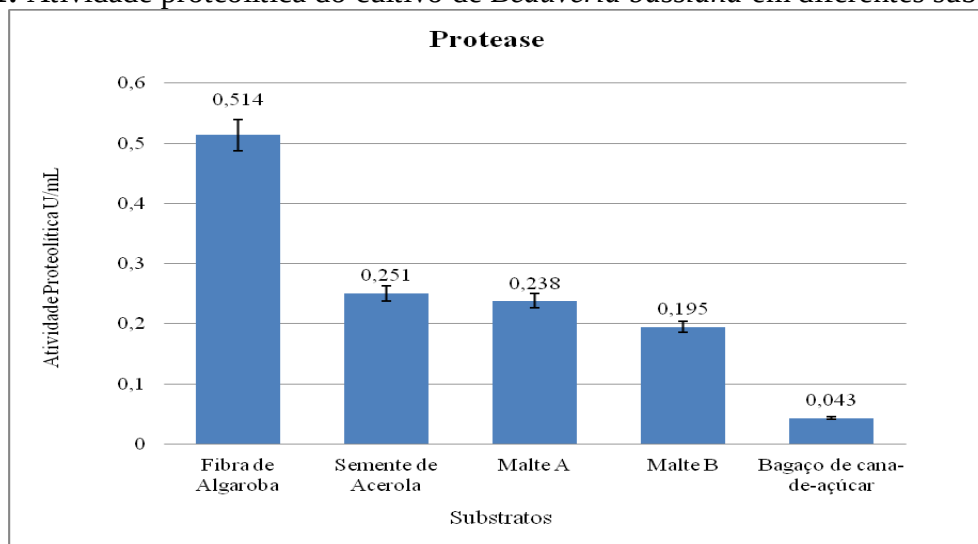
O uso do bagaço de cana-de-açúcar utilizado para produção de enzimas por fermentação em estado sólido favorece a aeração e troca de calor do meio. Além disso, o bagaço por conter celulose (50 %), hemicelulose (25 %), lignina (25 %) e cinzas (2,4 %) atuam como fonte de compostos indutores da expressão das enzimas (PANDEY et al., 2000).

Produção de enzimas proteolíticas

A atividade proteolítica foi analisada para caracterizar o complexo enzimático produzido por *B. bassiana*, como complementação das atividades amilolíticas e celulolíticas já analisadas, uma vez que as proteases são produzidas normalmente pela *B. bassiana* e a sua produção está estritamente relacionada com o processo de infecção dos insetos. As proteases permitem a penetração do tubo de germinativo do fungo entre a cutícula do inseto, que é formada por cerca de 70 % de proteínas (HEPBURN, 1985), contudo, sendo importante quantificá-la do ponto de vista da sua atuação auxiliar na atividade bioinseticida (**Figura 11**). De tal modo, os cinco substratos analisados (fibra de algaroba, semente de acerola, malte A, malte B e bagaço de cana-de-açúcar) apresentaram atividade proteolítica, sendo o substrato fibra de algaroba exibiu a

melhor atividade enzimática ($0,514 \pm 0,009$ U/mL).

Figura 11: Atividade proteolítica do cultivo de *Beauveria bassiana* em diferentes substratos.



Em estudo realizado por Ito et al. (2007) sobre produção de proteases extracelulares por uma estirpe brasileira de *B. bassiana* reativado na broca do café *Hypothenemus hampei* atingiu uma atividade de 0,489 U/mL. Cerca de 80 % desta atividade foi obtida após 2 dias de cultivo, ocorrendo uma abrupta redução após o quinto dia (ITO et al.,2007).

Menezes et al. (2006) observaram uma atividade enzimática da protease de 5,78 U/mL após 64 h de fermentação, utilizando os substratos resíduo de maracujá e farelo de trigo, com fungo *A. níger*. Resultado considerado superior ao encontrado nesse trabalho. Entretanto, utilizamos a fermentação em estado sólido e os substratos foram utilizados *in natura* sem qualquer pré-tratamento ou suplementação nutricional.

Além das enzimas amilolíticas, também foi determinada a quantidade de proteína total em cada um dos substratos no início do processo e após 10 dias de cultivo. E, ainda, o aumento

proteico proporcionado pela ação do complexo enzimático metabolizado durante o processo. Os resultados estão dispostos na **Tabela 5**.

Tabela 05: Quantidade de proteína total encontrada nos substratos antes e após 10 dias de cultivo da *Beauveria. bassiana*.

Amostra	[Proteína total] (g/100mL) Antes	[Proteína total] (g/100mL) Após	Aumento proteico [AP] (%)
Malte A	0,0107 ± 0,9	1,0821 ± 0,13	100,13
Malte B	0,0114 ± 0,31	3,8321 ± 0,06	335,15
Bagaço de cana	0,0107 ± 0,32	3,1536 ± 0,08	293,73
Semente de acerola	0,0132 ± 0,33	3,1833 ± 0,11	240,16
Fibra da algaroba	0,0110 ± 0,33	2,9571 ± 0,25	267,83

De acordo com os resultados obtidos, os substratos malte B, bagaço de cana, fibra de algaroba e semente de acerola alcançaram os maiores valores de aumento proteico ao final de 240 horas de processo fermentativo (335,15; 293,73; 267,83 e 240,16 %, respectivamente).

Durante o processo, a quantidade de proteínas totais se modificou em cada um dos substratos utilizados, mostrando um perfil satisfatório no aumento da produção de proteína total. Todos os substratos obtiveram um aumento significativo, entretanto o substrato que apresentou maior quantidade de proteínas foi o malte B com 3,8321 ± 0,06 g/100 mL (aumento proteico de 335,15 %), justificado pela maior concentração de amido presente no resíduo, indicativo da produção enzimática. Pode-se ainda destacar, que durante o processo fermentativo houve um enriquecimento proteico dos resíduos agroindustriais a partir do micro-organismo, o

metabolismo da *B. bassiana* proporcionou, através da sua produção enzimática, um aumento do teor proteico desses substratos após a fermentação, agregando maior valor nutricional quando comparado o valor nutricional desses substratos *in natura* (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

Agradecimentos

Ao Departamento de Micologia (Micoteca URM) da Universidade Federal de Pernambuco pela doação da linhagem fúngica, e ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba por ceder à estrutura física para realização de parte deste trabalho.

Referências Bibliográficas

AGUIAR, L.P. β -Caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento genético. Fortaleza. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. 87p. 2001.

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SALVA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B. S.; BHAVYA, D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B. S.; VARALAKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotechnol., v.6, p.576-581, 2007.

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: a review of its potentials and applications. African Journal of Biotechnology, Nairobi, v.10, p.324-331, 2011.

ARAUJO, L.F. Enriquecimento proteico do mandacaru sem espinhos *Cereus jamacaru* (P. DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fermentação semi-sólida. 2004. 195f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Graw-Hill Intl Editions, 2^a edição. p.928, 1986.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil. Evidência, Joaçaba v.11, p.15-28, 2011.

CRUZ, E. A.; MELO, A. M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. v.13, p.245-249, 2011.

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

CARVALHO, R. V., CÔRREA, T. L. R., SILVA, J. C. M, MANSUR, L. R. C. O, MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, v.39, p.102-107, 2008.

CARVALHO.T.;FILHO,G.A.;PACHECO,V.S.C.;FERREIRA,A.N.; ROCHA, T.J.O.; FRANCO.M. Produção De Enzimas Hidrolíticas Por Fermentação Em Estado Sólido Da Palma Doce (*Nopalea Coccinellifera*) Utilizando Modelos Estatísticos Significativos. Revista de estudos ambientais v.14, p.48-57, 2012

FARID, M. A. F.; SHATA, H. M. A. H. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. Iranian Journal of Biotechnology, v.9, p.267 –274, 2011.

FELLOWS, P. Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

FERREIRA, O. E. Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a produção de amilases fúngicas: Estudo de parâmetros fermentativos e caracterização das enzimas.Dissertação de Mestrado.Universidade Estadual Paulista-Jaboticabal.56p. 2011.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases prduzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 96p. 2006.

GONÇALVES, A. Z. P. Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas. Dissertação de Mestrado.Universidade Estadual Paulista 90p. 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELLI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 37, p. 474-480, 2006.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v.59, p.257-268, 1987.

GODOY, M. G. Produção de lipases microbianas e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 116 p. 2009.

GOMES, J. E.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G. et al. Análise de agrupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.22, p.36-39, 2000.

GONZAGA NETO, L.; MATHUZ, B.; SANTOS, C. A. F. Caracterização agrônômica de clones de aceroleira (*Malpighia* spp) na região do submédio São Francisco. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.21, p.110-115, 1999.

GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K. ; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process biochemistry. v.38, p.1599-1616, 2003.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; TORRES, E. F. Curso de Fermentaciones em Medio Sólido – Biotecnología para el Aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992

HARTREE, E. S. Determination of protein: a modification of Lowry methods that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry, San Diego, v. 9, p. 422-427, 1972.

HEPBURN, H. R. Structure of the Integument. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Eds., 3, Pergamon, Oxford, p.1-58, 1985.

HOLMQUIST-DONQUIS, I.; REY, G. R. Propiedades funcionales de la proteína de cují (*Prosopis juliflora*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas - Venezuela, v.47, p.343-351, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4d. São Paulo, 2005.

ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; PINOTTI, M. H. P.; NEVES, P. M. O. J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. Brazilian Journal of Biology and Biotechnology, Curitiba, v. 50, p. 217-223, 2007

JANSSEN, P. H.; MONK, C. R.; MORGAN, H. W. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. FEMS Microbiology Letters, v.120, p.195-200, 1994 .

KLAGENBOECH, R.; THOMAZINI, M. H.; SILVA, G. M. C. Resíduo Úmido de Cervejaria: Uma Alternativa na Alimentação Animal. In: EXPOUT, Toledo. Anais do III ENDICT - Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, 2011.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2ª ed., São Paulo. Editora Sarvier, 1995.

LIMA, U. A. Matérias-primas dos Alimentos. São Paulo: Ed Blucher, 402p. 2010.

LIMA, V. L. A. G.; MUSSER, R. S.; LEMOS, M. A. et al. Análise conjunta das características físico-químicas de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Belém, 2002.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Caracterização De Resíduos Cervejeiros. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

MENDES, B. V. Discurso proferido na sessão solene de abertura do 1º Simpósio Brasileiro sobre algaroba. In: Simpósio brasileiro sobre algaroba, Natal. EMPARN, p.9-13, 1982.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus Níger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. Revista Universidade Rural, v. 25, p. 15-27, 2006.

MELLO, V. S. A. Determinação da composição do bagaço do malte de cevada e estudo das suas potenciais aplicações. Dissertação de mestrado universidade de São Paulo- Lorena, 80p. 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., v.31, p.426-429, 1959.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewers' spent grain to produce xylitol. Journal of the Science of Food and Agriculture, Bognor Regis, v.85, p.2453-2460, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Oxford, v.81, p.268-274, 2006.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers spent grain: generation, characteristics and potential applications. J. Cereal Sci., v.43, p.1-14, 2006.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. Food Res Int. v. 42, p.443-448, 2009.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; Nigam, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: Sugarcane bagasse. Bioresour. Technol, v.74, p.69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v.13, p.81-84. 2003

PEREIRA, E. S. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e 30 parâmetros ruminais. Revista Brasileira de Zootecnia, Brasília, v.30, p.563- 572, 2001.

PIMENTEL, M. L.; MAIA, G. A.; OLIVEIRA, G. S. F. et al. Influência do processamento sobre a vitamina C do suco da acerola (*Malpighia glabra* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.23, p.143-146, 2001.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v.67, p.577-591, 2005.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Eletronic Journal of Biotechnology, v.1, p.3-45, 1998.

ROBERTSON, J. A.; I'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. Food Sci. Technol., v.43, p.890-896, 2010.

RODRIGUEZ - ZÚNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de Celulases por *Arpergillus niger* por fermentação em estado sólido. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.46, p.912-919, 2011.

SANTANA, R. S. M. Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 73p.2012.

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.148p. 2007.

SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; ROCHA, T. J. H.; FERREIRA, A. N.; DINIZ, G. A.; FRANCO, M. Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. Scientia Agraria Paranaensis. Mal. v. 12, p.115-123, 2013

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SILVA, C. G.; MATA, M. E. R. M. C.; BRAGA, M. E. D.; QUEIROZ, V. S. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.5, p.51-56, 2003.

SILVA, C. G. M.; MELO FILHO, A. B.; PIRES, E. F.; STAMFORD, T. L. M. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.27, p. 733-736, 2007.

SOARES, I.; TÁVORA, Z. Microorganism-produced enzymes in the food industry . InTech, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, 2012.

SOARES, L. C. S. R. Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena. 112p. 2012.

SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 143p. 2005.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.33, p.2267-2278, 2012.

STURMER, A. T.; LUANGSA-ARD, J. J.; ROBERTS, D. W. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v.5/6, p.85-88, 2004.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at three stages of maturity. Food Chemistry. v.71, p.195-198, 2000.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the food Science; 2° ed, New York: Marcell Dekker, Inc., Introduction to the hydrolases, p.387-389, 1994.

WISNIEWSKI, A. C.; MARIA ALMEIDA, A. L.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *macroclybe titans* em resíduo do processamento de cerveja, R. bras. Bioci., Porto Alegre, v.8, p.285-293, 2010.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, K. O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. Advances in Applied Microbiology, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.

ZANCHETTA, A. Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Paulista. 110p. 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

As metodologias empregadas para conidiogênese (produção, viabilidade, patogenicidade e virulência) e avaliação da atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares termoestáveis (proteases, amilases e celulasas) produzidas por *B. bassiana* em diferentes substratos, permitem concluir:

- Os conídios produzidos a partir dos substratos não convencionais foram viáveis e apresentaram efeito letal na concentração testada;
- A taxa de mortalidade dos cupins após infecção com os conídios produzidos nos diferentes substratos superaram 80 % de mortalidade;
- Na FES dos cinco substratos utilizados quatro deles apresentaram atividade amilolítica;
- Observou-se que as enzimas amilolíticas apresentaram temperatura ótima na faixa de 60° a 70° C e são termoestáveis;
- Bagaço de cana-de-açúcar foi o resíduo que apresentou a maior atividade celulolítica;
- Os substratos analisados na fermentação em estado sólido (Malte A e B, bagaço de cana-de-açúcar, fibra de algaroba e semente de acerola) mostram atividade proteolítica, que está estritamente relacionada com o processo de infecção dos insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. p. 405-412, 2001.

AGOSTINETTO, D.; FLECK, N. G.; RIZZARDI, M. A.; MEROTTO JUNIOR, A.; VIDAL, R. A. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. Ciência Rural, v.31, p.341-349, 2001.

AGUERO, J. M. Z. Estudo da Inativação da Glicoamilase e da Influência de Fosfatos na Produção da Enzima em Cultivos de *Aspergillus awamori*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 123p. 1998.

ALMEIDA, J. E. M. Controle de *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858) com isca associada a inseticidas e *Beauveria bassiana* em cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura, USP. Piracicaba. 131p. 1998.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. Boletim Técnico do Instituto Biológico, v. 16, p. 1-19, 2006.

ALONSO, F. O. M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Ed. Manole, p.73-126, 1986b.

ALVES, S. B. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, p.77-86, 1992.

ALVES, L. F. A.; ALVES, S. CAPALBO, D. M. F. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. Biocontrol Science and Technology, v. 7, p. 377-378, 1997a.

ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; CAPALBO, D. M. F. Seleção de material-prima para a elaboração de meio de cultura para a produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 26, p. 379-382, 1997b.

ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. 2ª ed. São Paulo: Editora Fealq, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998a.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Malone Ltda, Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998b.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 414 p, 2008a.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, p. 179-204, 2008.
- ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Process Biochemistry, v. 37, p. 331-338, 2001.
- AZEREDO, L. A. I.; LIMA, M. B.; COELHO, R. R. R.; FREIRE, D. M. G. A low cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp.594 using feather meal and corn steep liquor. Current Microbiology, v.53, p.535- 539, 2006.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de Micro-organismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil. Evidências, Joaçaba, v.11, p.15-28, 2011.
- BARNETT, H. L. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 225, 1958.
- BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. Biodegradation, v. 3, p.171-188, 1993.
- BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, v. 39, p. 723-728, 2002.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their Potential Industrial Application. Biotechnol adv, v.15, p. 586 – 620, 1997.
- BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D.W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. Memoirs of the Entomological Society of Canada, v. 171, p. 213-224, 1997.
- BIDOCHKA, M. J.; KACHATOURIANS, G. G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. v. 56, p.362-370, 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Bon, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado, Rio de Janeiro. Ed. Interciência p, 241-271, 2008.
- BROOKS, A. J.; WAAL, R. Infection of *Psoroptes mites* with the fungus *Metarhizium anisopliae*. Experimental and Applied Acarology, v. 25, p. 869-880, 2001.
- BUENO, V. H. P. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras, UFLA, 196p, 2000.
- BURDON, J. J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. Annu. Rev. Phytopathol. v.31, p.305-323, 1993.
- CABRAL FILHO, S. L. S. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 68p. 1999.
- CAMPOS, R. A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J. T.; SILVA, M. V.; BARROS, M. N.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and Regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. Current Microbiology, v. 50, p 257-271, 2004.
- CARVALHO, R. V.; CÔRREA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; MANSUR, L. R. C. O.; MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, p.102-107, 2008.
- CEREDA, M. P. Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, Universidade Estadual Paulista. 56p, 1996.
- CLARK, J. H.; MURPHY, M. R.; CROOKER, B. A Supplying the protein needs of dairy Cattle by products feeds. Journal of Dairy Science, v.70, p.1092-1109, 1987.
- COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B.CEPPA, Curitiba, v.19, p.33-42, 2001.
- CORDOVA, J.; NENMAOWI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJLALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.5, p.75-78, 1998.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Rio Claro, (Ed.), 128p, 2002.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering, in press, v.76, p.291-302, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

CRUZ, B. C. C. Caracterização físico-química e composição química do semimembranosus e *Triceps brachii* de Cordeiros Dorper X Santa Inês alimentados com diferentes componentes da algaroba. Tese de Doutorado. Universidade Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga.110p. 2015.

DA COSTA, G. L.; SARQUIS, M. I. M.; DE MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. Mycopathologia, v. 154, p. 207-209, 2002.

DALLA SANTA, H. S.; DALLA SANTA, O. R.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 51-60, 2005.

DANTAS, M. E.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. v.12, p.81-87, 2010.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. Industrial Crops and Products, v. 29, p.404-411, 2009.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. Applied Microbiology and Biotechnology, v.33, p.712-715, 1990.

DZIEDZIC, S. Z.; KEARSLEY, M. W. Glucose Syrups: Science and Technology. Elsevier Applied Science Publishers. Londres, 402 p. 1984.

ELLIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RANAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.;ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, v.39, p. 525-528, 2004.

EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Biological Sciences, Bombay, v.6, p.269-274, 2006.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, v. 23, p. 409-442, 1978.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A. P; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A. P; BARATTO, C. M; KOGLER, V.; SILVA, M. V.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. et al. Biotecnologia aplicada ao Pesquisa controle biológico. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.23, p.32-37, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quim. Nova*, v. 29, p. 811-816, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA – NETO, S.; CARVALHO, R. P. L. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920 p. 2002.

GUIRADO, N.; AMBROSANO, E. J. R.; ROSSI, F.; DIAS, F. L. F. Controle de Cupins de Montículo com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. *Rev. Bras. De Agroecologia*, v. 4, p.269-272, 2009.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; TORRES, E. F. Curso de Fermentaciones em Medio Sólido Biotecnología para el aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v.30, p. 136-145, 2007.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K.; Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol*, v.89, p.17-34, 2003.

HASTUTI, B.S.; GLARE, T.R.; CHAPMAN, R.B. Susceptibility of life stages of *Paropsis charybdis* to *Beauveria bassiana*. *Proceedings of the Fifty Second New Zealand Plant Protection Conference*. v.52, p.98-102; 1999.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation -are there any biotechnological advantages. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 301– 306, 2005.

HOWART FG. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology*. v.36 p.485-509,1996.

HSIAO, N. W.; CHEN, Y.; KUAN, Y. C.; LEE, Y. C.; LEE, S. K.; CHAN, H. H.; KAO, C. H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.17, p.89-94, 2014.

HUIGE, N. J. Brewery by-products and effluents. In: HARDWICK, W. A. (ed). *Handbook of brewing*. New York; Marcel Dekker, p. 501-550,1994.

IBRAHIM, Y. B.; LOW, W. Potencial of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management*, v.39, p.288-292, 1993.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v. 40, p.1263-1270, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 74, p. 213-223, 1999.
- KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W. ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell*, Rockville, v.11, p. 2075-2085,1999.
- KRISHNA, K.; WEESNER, F. M. *Biology of termites*. New York: Academic Press. v.1, 598p. 1969.
- KRISHNA, K.; WEESNER, F. (eds.). *Biology of Termites*. New York: Academic Press. 1970.
- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 561-594, 1999.
- LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental, *Quim. Nova*, v. 33, p.324-328, 2010.
- LAZZARINI, G. M. J. Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 46p, 2005.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto: Livroceres. 92p, 2003a.
- LIMA, D. F. et al. Avaliação nutricional da farinha de Algaroba (*Prosopis juliflora*): preparo, composição centesimal e toxidez. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v. 26, p.193, 1983.
- LORENCINI, P. Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio-Ribeirão Preto. Dissertação de mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e letra de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.74p. 2013.
- MACEDO, N. Atualizações no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar, p. 121125. In E. Berti-Filho; L.R. Fontes (eds.), *Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba, FEALQ, 183p. 1995.
- MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. *Visão Agrícola*, v. 1, p. 38-46, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª ed. São Paulo: Pearson Education. p. 463-467, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M .;PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. Journal of Biotechnology, v. 163, p.38-44, 2013.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crytalline cellulose degradation. Cellulose. Dordrecht, Netherlands, v.10, p. 159-169, 2003.

MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do Bagaço de Cana-de-açúcar Tratado com Reagentes Químicos e Pressão de Vapor. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, p.1196-1204, 2000.

MARINO NETTO, L. Acerola, a cereja tropical. São Paulo: Nobel. 94p, 1986.

MARTINS, T. S. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JOHSSIM, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinat xylose-utilising *Sacharomyces cerevisiae*. Enzyme Micrib. Technol., v.31, p.274-282, 2002.

MASCARIN, G. M. Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico / Gabriel Moura Mascarin, Eliane Dias Quintela. – Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

MELLO JR. C. Processamento de grãos de milho e sorgo visando aumento do valor nutritivo. In.: Simpósio sobre nutrição de bovinos, Piracicaba, SP: FEALQ, p.263-283, 1991.

MENDES, B. V. Discurso proferido na sessão solene de abertura do 1º Simpósio Brasileiro sobre algaroba. In: Simpósio brasileiro sobre algaroba, Natal. EMPARN, p.9-13, 1982.

MICHELIN, M. Estudo da glucoamilase e da α -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, 2006.

MONTEIRO, V. N. ; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos, v.3, p.9-23 2009.

MOREIRA, G. E. G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsula do resíduo agroindustrial de acerola. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 72p. 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D.; EVANS, H. C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. Mycological Research, Cambridge, v.92, p. 199-209, 1989.

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K.; Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Engineering Journal, v.39 p.353-361, 2008.

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. Plant Physiology, v.122, p. 989-997, 2000.

NELSON, T. L.; LOW, L.; GLARE, T. R. Large scale production of New Zealand strain of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* sp. In: Conference Proceeding. The New Zealand Plant Protection Society Incorporated: New Zealand Plant Protection Society, 1966. v. 49, p.257-261, 1996.

NC-IUBMB, 2011. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 09 jul. 2016.

ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanases production. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 689-695, 2001.

OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. S.; KOBAYASHI, A. K.; RITZINGER, R. Aspectos botânicos. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P. A cultura da aceroleira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 198 p, 2003.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações, SaBios: Rev. Saúde e Biol. v.7, p.97-109, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: Sugarcane bagasse. Bioresour. Technol, v.74, p.69-80, 2000.

PALMA-FERNANDEZ, E. R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Folia Microbiol. v. 47, p.685-690, 2002.

PARRA, J. P. P. et al. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. Barueri: Manole, 587 p, 2002.

PEREIRA, E. S. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e 30 parâmetros ruminais. Revista Brasileira de Zootecnia, Brasília, v.30, p.563- 572, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*v.24,p.161-177, 2005.

REDDY, L. V. A.; WEE, Y.; YUN, J.; RYU, H. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, v.99, p.2242-2249, 2008.

REINOLD, M. R. Manual prático de cerveja. São Paulo: Aden editora e comunicação, 213p,1997.

RIBASKI, S. A. G.; HOEFLICH, V. A.; RIBASKI, J. Sistemas Silvopastoris como Apoio ao Desenvolvimento Rural para a Região Sudoeste do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, p. 27-37, 2009.

ROBERTO, I. C., SILVA, S. S., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M., SATO, S. Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of xylitol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v.57,p.339-347, 1996.

RODRIGUEZ - ZÚNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de Celulases por *Arpergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.46, p.912-919, 2011.

ROBL, D.; SUNG, L. B.; NOVAKOVICH, J. H.; MARANGONI, P. R. D.; ZAWADNEAK, M. A. C.; DALZOTO, P. R.; GABARDO, J.; PIMENTEL, I. C. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40 p.296-300, 2009.

SANCHÉS, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnological Advances*, Berlin, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANTANA, R. S. M. Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 73p. 2012.

SANTOS, V. T. O. Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático. Dissertação de mestrado, Escola de engenharia de Lorena-USP.101p, 2010.

SCHENCK, F. W.; HEBEDA, R. E. Starch Hydrolysis Products: Worldwide Technology, Production, and Applications. Vch Publishers, Inc. New York. 650p,1992.

SENE, L.; ALVES, L. F. A.; LOBRIGATTE, M. F. P.; THOMAZONI, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.7, p.449-456, 2010.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 61, p. 413-423, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Appl Biochem Biotechnol*, v.179, p.1346–1380, 2016.

SHIKHA, S. A.; DARMWAL, N. S.; *Bioresour. Technol.*, v.98, p.881.2007

SILVA, S. Algarobeira (*Prosopis Juliflora* (Sw) D. C) no Nordeste do Brasil. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Produção Agropecuária, Secretaria da Produção Animal, Brasília, 74p,1989.

SILVA, S. A. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. *Quim. Nova*, v.24, p.460-464, 2001.

SILVA, L. F. et al. *Prosopis juliflora* Pod Flour and Syrup Processing and Nutritional Evaluation. The Current State of Knowledge on *Prosopis juliflora*, p. 405-418, 1990.

SILVA, C. H. C.; PULS, J.; SOUSA, M. V; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p.152-156, 2000.

SILVA, L. F. et al. Efeitos da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora*) durante as fases de gestação e lactação em ratas wistar. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 25, p. 459-465, 2003.

SILVA, R. P. Patogenicidade da *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL sobre cupins urbanos. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em ciências biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 32p. 2012.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência Tecnologia e Alimentos*, Campinas, v. 28, p. 116-124, 2008.

SOUZA, E. F. Aplicação de proteases e amilases produzidas por *Bacillus sp.* smia-2 na Remoção de manchas de tecidos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. RJ. 60p. 2012.

SPIER, M. R. Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SOARES, L. C. S. R. Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena. 112p. 2012.

STURMER, A. T.; LUANGSA-ARD, J. J.; ROBERTS, D. W. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Científica, Ciências Biológicas. Saúde*, v.5/6, p. 85-88, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

STÜRMER, A. T. et al. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v. 5/6, p. 85-88, 2003/2004.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid state fermentation. Process Biochemistry, Oxford, UK, v.39, p.1893-1898, 2004.

VALADARES-INGLIS, M. C.; AZEVEDO, J. L. Amylase and protease secretion in recombinant strains of *Metarhizium anisopliae* var. following parasexual crosses. Brazilian Journal of Genetics, v.20, p.171-175, 1997.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Origem da cultura e sua importância. In: Teoria e prática do manejo de infestantes na cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Porto Alegre: Ribas A. Vidal.136 p, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; ARUN, A.; AL-DHABI, N. A.; VICENT, S. G .P.; ARASU, M. V.; CHOI, K. C. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulose and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation. Biotechnology for Biofuels, v. 9, p. 1-13, 2016.

VILAS-BOAS, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LUNA-ALVES-LIMA, E. A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, v.35, p.749-761, 1992.

VILLAS-BÔAS, S. G., ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.14, p.38-42, 2000.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. Revista Hestia Citino, Ciência, tecnologia, inovação e oportunidade, v.1, p.30-36, 2011.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais, Ciência Rural, Santa Maria, v.38, p.1184-1192, 2008.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the food Science; 2° ed, New York: Marcell Dekker,Inc.,Introduction to the hydrolases, p.387-389, 1994.

WILSON, E. O. The insect societies.Cambridge: Belkap Press. 548p, 1971.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, K. O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. Advances in Applied Microbiology, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v.40, p.36-40, 1982.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. v. 24, p. 452-481, 2006.