

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

Eliana Albornoz Alves

**PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS  
A PARTIR DE *Beauveria bassiana***

Santa Maria, RS  
2018

**Eliana Albornoz Alves**

**PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A PARTIR  
DE *Beauveria bassiana***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Cristine Kuhn

Santa Maria, RS  
2018

Albornoz Alves, Eliana  
PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A  
PARTIR DE *Beauveria bassiana*. / Eliana Albornoz Alves.-  
2018.  
100 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti  
Coorientadora: Raquel Cristine Kuhn  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química, RS, 2018

1. Quitinase 2. b-1,3-glucanase 3. Endocelulase 4.  
Exocelulase 5. Fermentação I. Mazutti, Marcio Antonio II.  
Kuhn, Raquel Cristine III. Título.

**Eliana Albornoz Alves**

**PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A PARTIR  
DE *Beauveria bassiana***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado em 27 de agosto de 2018:



---

Marcio Antonio Mazutti, Dr (UFSM)  
(Presidente/Orientador)



---

Raquel Cristine Kuhn, Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
(Coorientadora)



---

Marcus Bruno Soares Forte (UNICAMP)



---

Kátia Regina Kuhn (UFSM)

Santa Maria, RS  
2018

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o inestimável apoio de várias pessoas.

Agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti e minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Cristine Kuhn por acreditarem em minha capacidade e trabalho e serem responsáveis por grande parte de minha formação acadêmica, desde a iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, conversas e bons momentos compartilhados nesses dois anos. Em especial à Stéfani, pela imensurável ajuda conversas, risadas e companhia, principalmente nos finais de semana e feriados de infinitas análises.

Aos meus pais, pela minha vida e por todo o incentivo nestes anos.

Meu agradecimento especial a minha rainha: mãe. Sem teu apoio e amor nunca chegaria tão longe. Se estou aqui, hoje, é porque tu estiveste do meu lado sempre...minha eterna gratidão!

A meu irmão, por seu apoio e incentivo, que mesmo a quilômetros de distância se fez presente de uma forma ou outra.

Ao meu namorado, pelo suporte, paciência, carinho e encorajamento. Tu acreditas em mim mesmo quando eu não o faço e me faz ver que para tudo há uma solução. Tu me fazes ver que sou mais do que imagino ser e está comigo em todos os momentos.

A minha família do muaythai, que entre beijos e cotoveladas, entre treinos, conversas e pizzas, tornam meus dias mais leves e felizes. São mais importantes do que imaginam, obrigada!

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a todos os professores e técnicos pelo auxílio e ensinamentos.

Finalmente, agradeço à CAPES por conceder a bolsa de estudos para a realização do mestrado.

*Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente que prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-la.*

*Impossível não é um fato, é uma opinião.*

*Impossível não é uma declaração, é um desafio.*

*Impossível é hipotético.*

*Impossível é temporário.*

*(Muhammad Ali)*

## RESUMO

### PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A PARTIR DE *Beauveria bassiana*

AUTORA: Eliana Albornoz Alves  
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

O fungo *Beauveria bassiana* tem se destacado na produção de estruturas de infecção e na síntese de um coquetel de proteínas, enzimas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários bioativos, responsáveis pela atividade entomopatogênica e virulência. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi produzir via fermentação em estado sólido e submersa, concentrar e caracterizar enzimas hidrolíticas (quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endocelulase e exocelulase) a partir de *Beauveria bassiana*. A atividade enzimática foi superior em substrato sólido quando comparado ao meio submerso, sendo 52,5% maior para exocelulase, 22,0% para endocelulase e 18,1% para  $\beta$ -1,3-glucanase, mas a atividade de quitinase permaneceu a mesma. A ultrafiltração foi mais eficiente quando utilizada a membrana de 10 kDa, a uma pressão de 4 bar e a proporção de permeado e retido de 1:1. A possibilidade de reuso da membrana utilizando uma solução de limpeza oxidante foi viável apenas para um reuso. Ainda, as enzimas mostraram-se altamente estáveis a 40°C, sendo mais termoestáveis em temperaturas mais elevadas. Em meios menos ácidos, as enzimas mostraram-se mais instáveis, sendo o pH 4 o mais adequado para manter sua atividade por períodos de tempos maiores. Por último, a aplicação da fração permeada em larvas de *Phereoeca uterella* (traça-das-paredes) mostrou melhores resultados. A maior concentração de enzimas hidrolíticas, principalmente quitinase, presente nesta fração facilitou a degradação da parede celular destes insetos. Este estudo abre espaço para trabalhos mais aprofundados na otimização das condições de processo trazendo resultados promissores para a possibilidade de aumento de escala.

Palavras-chave: Quitinase. Exocelulase. Endocelulase.  $\beta$ -1,3-Glucanase. Fermentação. Concentração.

## ABSTRACT

### PRODUCTION AND CONCENTRATION OF HYDROLITIC ENZYMES BY *Beauveria bassiana*

AUTHOR: Eliana Albornoz Alves  
ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

The fungus *Beauveria bassiana* has been prominent in the production of infection structures and in the synthesis of a cocktail of proteins, enzymes, organic acids and secondary bioactive metabolites, responsible for the entomopathogenic activity and virulence. Thus, the aim of this work was to produce via solid-state and submerged fermentation, to concentrate and characterize hydrolytic enzymes (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endocellulase and exocellulase) by *Beauveria bassiana*. Enzyme activity was superior in solid substrate when compared to submerged, being 52,5% higher for exocellulase, 22,0% for endocellulase and 18,1% for  $\beta$ -1,3-glucanase, but chitinase activity remained the same. The ultrafiltration was more efficient when used a 10 kDa membrane, a pressure of 4 bar and the ratio of permeate and retentate of 1:1. The possibility of membrane reuse using an oxidant cleaning solution was viable only for one reuse. Furthermore, the enzymes were highly stable at 40°C, being more thermostable at higher temperatures. In lower acid media, enzymes were more unstable, with pH 4 being more suitable to maintain their activity for longer periods of time. Finally, the application of the permeate fraction in *Phereoeca uterella* (household casebearer) larvae showed better results. The higher concentration of hydrolytic enzymes, mainly chitinase, present in this fraction facilitated the degradation of the insect cell wall. This study opens up space for more in-depth work on the optimization of process conditions, promising results for the possibility of scale-up.

Keywords: Chitinase. Exocellulase. Endocellulase.  $\beta$ -1,3-Glucanase. Fermentation. Concentration.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Processo de infecção pelo fungo <i>B. bassiana</i> .....	16
Figura 2- Hidrólise da quitina por uma quitinase .....	25
Figura 3- Hidrólise da $\beta$ -1,3-glucana por uma $\beta$ -1,3-glucanase .....	26
Figura 4: Hidrólise da celulase por exocelulase, endocelulase e celobiase .....	28
Figura 5- Fluxograma da metodologia experimental .....	30
Figura 6- Fluxo de permeado em função do tempo em diferentes pressões .....	67
Figura 7- Permeabilidade da água antes e depois do processo de ultrafiltração utilizando diferentes proporções de permeado e retido (a) P50% R50%; (b) P75% R25%; (c) P25% R75%. .....	72
Figura 8- Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes proporções de permeado e retido .....	73
Figura 9 - Permeabilidade à água da membrana antes e após o (a) primeiro, (b) segundo, (c) terceiro e (d) quarto uso. ....	74
Figura 10- Fluxo de permeado em função do tempo após a reutilização da membrana .....	74
Figura 11- Curva de contorno da atividade de endocelulase .....	79
Figura 12- Curva de contorno da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.....	79
Figura 13- Curva de contorno da atividade de quitinase .....	79
Figura 14- Estabilidade térmica de (a) exocelulase, (b) endocelulase, (c) $\beta$ -1,3-glucanase e (d) quitinase. ....	82
Figura 15- Estabilidade ao pH de (a) exocelulase, (b) endocelulase, (c) $\beta$ -1,3-glucanase e (d) quitinase. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica .....	18
Tabela 2- <i>Screening</i> de substrato para fermentação submersa.....	32
Tabela 3- Matriz do planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios, variáveis codificadas e reais (entre parênteses). .....	33
Tabela 4- Seleção do substrato para fermentação em estado sólido.....	35
Tabela 5- Matriz do planejamento Plackett & Burman com 8 ensaios .....	36
Tabela 6- Características das membranas.....	41
Tabela 7- Matriz experimental do DCCR.....	43
Tabela 8- Atividades enzimáticas da seleção de substrato na FS .....	47
Tabela 9- Matriz experimental (PB12) e respectivas atividades enzimáticas na FS ..	48
Tabela 10- Comparação da atividade enzimática em FS.....	50
Tabela 11- Efeito das variáveis na atividade de exocelulase em FS.....	51
Tabela 12- Efeito das variáveis na atividade de endocelulase em FS .....	52
Tabela 13- Efeito das variáveis na atividade de $\beta$ -1,3-glucanase em FS.....	52
Tabela 14- Efeito das variáveis na atividade de quitinase em FS .....	53
Tabela 15- Concentração de biomassa fúngica e variação de pH na FS.....	54
Tabela 16- Atividades enzimáticas das enzimas em diferentes substratos na FES..	55
Tabela 17- Matriz experimental PB8 e respectivas atividades enzimáticas na FES ..	56
Tabela 18- Comparação da atividade enzimática em FES .....	57
Tabela 19: Efeito das variáveis na atividade de exocelulase em FES .....	58
Tabela 20- Efeito das variáveis na atividade de endocelulase em FES .....	59
Tabela 21- Efeito das variáveis na atividade de $\beta$ -1,3-glucanase em FES .....	59
Tabela 22- Efeito das variáveis na atividade de quitinase em FES .....	60
Tabela 23- Variação de umidade (H) e pH em FES .....	61
Tabela 24- Concentração de exocelulase em três membranas diferentes.....	62
Tabela 25- Concentração de endocelulase em três membranas diferentes .....	62
Tabela 26- Concentração de $\beta$ -1,3-glucanase em três membranas diferentes.....	63
Tabela 27- Concentração de quitinase em três membranas diferentes .....	64
Tabela 28- Concentração de exocelulase em três pressões diferentes .....	65
Tabela 29- Concentração de endocelulase em três pressões diferentes .....	65
Tabela 30- Concentração de $\beta$ -1,3-glucanase em três pressões diferentes .....	66
Tabela 31- Concentração de quitinase em três pressões diferentes.....	66
Tabela 32- Concentração de exocelulase para diferentes proporções de permeado e retido .....	68
Tabela 33- Concentração de endocelulase para diferentes proporções de permeado e retido .....	69
Tabela 34- Concentração de $\beta$ -1,3-glucanase para diferentes proporções de permeado e retido .....	70
Tabela 35- Concentração de quitinase para diferentes proporções de permeado e retido .....	71
Tabela 36- Atividade específica e fator de purificação de quitinase e $\beta$ -1,3-glucanase após o reuso da membrana .....	75
Tabela 37- Matriz do DCCR para temperatura e pH e atividades enzimáticas .....	77
Tabela 38- Constante de inativação e tempo de redução decimal das enzimas em diferentes temperaturas. ....	83
Tabela 39- Constante de inativação e tempo de redução decimal em diferentes pH, a 30°C .....	86

Tabela 42- Efeito das variáveis T e pH na atividade de endocelulase .....	98
Tabela 43- Análise de variância para a atividade de endocelulase .....	98
Tabela 44- Efeito das variáveis T e pH na atividade de exocelulase .....	98
Tabela 45- Efeito das variáveis T e pH na atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.....	99
Tabela 46- Análise de variância para a atividade de $\beta$ -1,3-glucanase .....	99
Tabela 47- Efeito das variáveis T e pH na atividade de quitinase .....	99
Tabela 48- Análise de variância para a atividade de quitinase .....	100

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO .....	14
3.2 FUNGOS EM CONTROLE BIOLÓGICO.....	15
3.3 PANORAMA NO BRASIL.....	17
<b>3.3.1 Controle Biológico no Brasil</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.2 Uso de fungos para controle biológico no Brasil</b> .....	<b>18</b>
3.4 <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> COMO INSETICIDA.....	19
3.5 <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> COMO ENDÓFITO .....	21
3.6 ENZIMAS HIDROLÍTICAS .....	23
<b>3.6.1 Quitinase</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6.2 <math>\beta</math>-1,3-Glucanase</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6.3 Celulases</b> .....	<b>26</b>
3.7 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO.....	31
4.2 OBTENÇÃO DO PRÉ-INÓCULO .....	31
4.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	31
<b>4.3.1 <i>Screening</i> de substrato em FS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.3 Obtenção do caldo enzimático</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.4 Obtenção da biomassa seca</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.5 Avaliação do pH final</b> .....	<b>34</b>
4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	34
<b>4.4.1 <i>Screening</i> de substrato em FES</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FES</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4.3 Obtenção do caldo enzimático</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4.4 Avaliação da umidade final</b> .....	<b>37</b>
<b>4.4.5 Avaliação do pH inicial e final</b> .....	<b>37</b>
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXOCELULASE.....	37
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOCELULASE.....	38
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\beta$ -1,3-GLUCANASE .....	38
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE QUITINASE .....	38
4.9 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES .....	39
4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	39
4.11 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS .....	40
<b>4.11.1 Tipo de membrana</b> .....	<b>41</b>
<b>4.11.2 Pressão de trabalho</b> .....	<b>41</b>
<b>4.11.3 Proporção entre permeado e retido</b> .....	<b>41</b>
<b>4.11.4 Reutilização da membrana</b> .....	<b>42</b>
4.12 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CONCENTRADAS .....	42
4.13 ESTABILIDADE DE ENZIMAS.....	43
<b>4.13.1 Estabilidade Térmica</b> .....	<b>44</b>
<b>4.13.2 Estabilidade ao pH</b> .....	<b>44</b>
4.14 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	44

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	46
<b>5.1.1 Screening de substrato em FS.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.3 Biomassa seca e variação de pH .....</b>	<b>53</b>
5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	54
<b>5.2.1 Screening de substrato em FES .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FES .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.3 Umidade e pH finais .....</b>	<b>60</b>
5.3 CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	61
<b>5.3.1 Seleção da membrana.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.2 Pressão de trabalho .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3.3 Proporção entre permeado e retido.....</b>	<b>67</b>
<b>5.3.4 Reutilização da membrana .....</b>	<b>73</b>
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CONCENTRADAS .....	75
5.5 ESTABILIDADE DE ENZIMAS.....	80
<b>5.5.1 Estabilidade térmica.....</b>	<b>80</b>
<b>5.5.2 Estabilidade ao pH .....</b>	<b>83</b>
5.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	86
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o cultivo de biomassa microbiana que envolve matriz sólida e é realizada na ausência de água livre (LI; PENG; CHEN, 2013). Esta tecnologia está se expandindo rapidamente e é importante na produção de produtos de alto valor agregado, por exemplo, enzimas, a partir de subprodutos agroindustriais. A FES vem adquirindo importância nos últimos anos, devido às altas taxas de produção de biomassa e enzimas empregando culturas de fungos, permitindo maior produção de enzimas em comparação com a fermentação submersa (FS) (BEHERA; RAY 2016). Devido à quantidade limitada de água, os custos operacionais são reduzidos como resultado de menores volumes de reação, bem como menores custos de energia (MANTZOURIDOU; PARASKEVOPOULOU; LALOU, 2015). Ainda, por terem os fungos o meio sólido como habitat natural, a FES reproduz melhor essas condições facilitando a secreção de enzimas (LI; PENG; CHEN, 2013).

Por outro lado, a fermentação submersa é caracterizada pelo uso de um meio líquido. Em comparação com a FES, os processos submersos são de operacionalização mais fácil, proporcionam maiores volumes, permitem maior uniformidade de temperatura, distribuição de nutrientes e microrganismos, além de facilitar o controle de variáveis. A absorção de nutrientes e a excreção de metabólitos são mais eficientes, resultando em menor tempo de fermentação e maior produtividade (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Ambos os processos fermentativos são amplamente utilizados na produção de enzimas de degradação da parede celular, principalmente a partir de fungos. Entre eles, destaca-se *Beauveria bassiana*, que produz estruturas de infecção para controle biológico e sintetiza um coquetel de proteínas, enzimas, ácidos orgânicos (principalmente ácido oxálico, que enfraquece a integridade da cutícula do inseto) e metabólitos secundários bioativos, responsáveis pela atividade entomopatogênica e virulência. Dentre o coquetel de proteínas, as mais estudadas e produzidas por este fungo são as quitinases, importantes na degradação da cutícula de insetos e que lhe garante seu potencial inseticida.  $\beta$ -1,3-glucanases são importantes devido ao seu caráter antifúngico, e, atuando sinergicamente com a quitinase, lhe confere um enorme potencial para o controle biológico. Outras enzimas proeminentes no controle biológico são celulasas, um complexo multienzimático que hidrolisa o

polímero de celulose em açúcares solúveis, o principal composto das células vegetais. Esse processo envolve a ação de um conjunto de enzimas cuja atividade é sinérgica e é dividido em três grupos: endocelulases, exocelulases e  $\beta$ -glicosidases.

Sendo assim, este trabalho visa à produção de um complexo enzimático formado por quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endo e exocelulases, avaliando sua produção por meio de um processo fermentativo submerso e em estado sólido, para posterior concentração e caracterização.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, concentrar e avaliar a estabilidade das enzimas quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, exocelulase e endocelulase produzidas por *Beauveria Bassiana* (IBCB 66) por diferentes processos fermentativos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o melhor substrato para a fermentação submersa e em estado sólido;
- Determinar as melhores condições (umidade, concentração de inóculo e composição do meio) da fermentação em estado sólido;
- Determinar as melhores condições (pH e composição do meio) da fermentação submersa;
- Selecionar uma membrana de ultrafiltração para concentração das enzimas;
- Definir as condições de concentração (pressão, proporção permeado:retido) das enzimas em sistema de separação por membranas;
- Analisar através de um planejamento de experimentos as condições ótimas de temperatura e pH;
- Avaliar a estabilidade das enzimas frente à temperatura e ao pH;
- Avaliar atividade biológica do extrato concentrado em larvas de *Phereoeca uterella* (Lepidoptera: Tineidae).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

O uso intensivo de produtos agroquímicos, em sua maioria de organoclorados e organofosforados levam a grandes prejuízos ambientais e à saúde humana, bem como à rápida seleção de insetos resistentes (PEREIRA; MARTINS, 2016). Além destes prejuízos, o desaparecimento de algumas espécies de insetos e a aparição de novas pragas são uma consequência (FLORES, et al., 2004). O tempo de degradação destes químicos no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar (FRANCESCHINI et al., 2001). Estes produtos podem se infiltrar no solo e alcançar águas subterrâneas e poços utilizados para abastecimento de água para uso doméstico, contaminando o homem e os demais seres vivos que fazem parte do ecossistema (PARRA et al., 2002; FLORES et al., 2004; GARCIA, 2004). Tal problemática tem estimulado, cada vez mais, a necessidade de uma manipulação mais prudente e, dentre as práticas mais indicadas, encontra-se a utilização do controle biológico (GARCIA, 2004).

A premissa básica do controle biológico é controlar as pragas agrícolas e os insetos transmissores de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitoides, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias (EMBRAPA, n.d.). O controle biológico foi utilizado, em um primeiro momento para o controle de insetos, ácaros e ervas-daninhas, mas com o tempo ampliaram-se os horizontes e sua aplicação se estende a outros invertebrados, patógenos de plantas e até mesmo alguns vertebrados (PARRA et al., 2002). É um método de controle racional e sadio, que tem como objetivo final utilizar esses inimigos naturais que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população (EMBRAPA, n.d.).

Atualmente, vem sendo atribuída uma importância cada vez maior dentro do programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), quando se coloca em questão a produção integrada rumo à agricultura sustentável. O MIP é uma técnica que visa manter as pragas sempre abaixo do nível em que causam danos para as lavouras, sendo uma alternativa proposta pela comunidade científica para diminuir o uso de agroquímicos (PARRA et al., 2002).

### 3.2 FUNGOS EM CONTROLE BIOLÓGICO

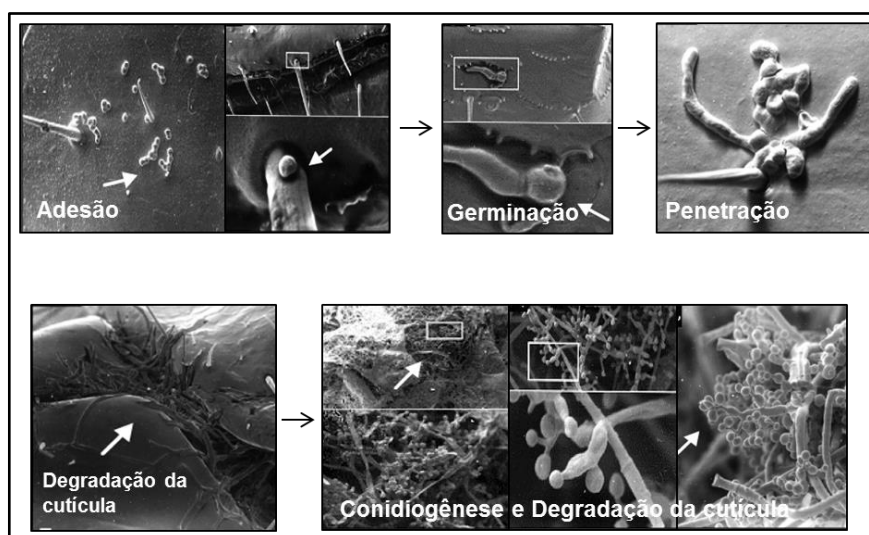
Todas as espécies de seres vivos possuem inimigos naturais e, especificamente, os inimigos naturais de insetos, são chamados de inseticidas microbianos, biopesticidas, agentes entomopatogênicos ou simplesmente entomopatógenos. São eles vírus, fungos e bactérias, que atingem os diferentes estágios de desenvolvimento (ovos, larvas, pupas e adultos). O grupo mais importante de microrganismos utilizados para controle biológico de insetos são os fungos filamentosos, os quais causam cerca de 80% das doenças em seus hospedeiros (GARCIA, 2004). Existem mais de 700 espécies de entomopatógenos, sendo as espécies dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* as mais frequentemente utilizadas no biocontrole (JUNGES, 2010). Em comparação a outros agentes, estes têm a vantagem de ter um mecanismo de infecção diferenciado e mais eficaz, ao penetrar nos seus hospedeiros via tegumento, sem a necessidade de ingestão oral para que ocorra o processo infeccioso (ALVES, 1998; FRANCESCHINI et al., 2001).

Porém, o maior obstáculo para a utilização de fungos filamentosos no controle biológico é o grande intervalo de tempo entre a sua aplicação e a morte dos hospedeiros, quando comparados aos agentes químicos. Durante esse período de tempo, as pragas podem causar sérias perdas na produtividade. No estudo destes microrganismos, os objetivos se concentram no aumento da velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biopesticida, sua produção, estabilidade e aplicação de inóculos. O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro (ALVES, 1998). Conhecer estas condições permite compreender a natureza da patogenicidade e acelerar o processo de infecção diminuindo, desta forma, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro (FRANCESCHINI et al., 2001).

O grupo dos artrópodes é o mais abundante e diverso sobre a terra sendo infectado por diversos patógenos, como vírus, fungos e bactérias, sendo a maioria das infecções em insetos causada por fungos. O impacto dessa relação na população de insetos ressalta o potencial de utilização destes microrganismos para o controle biológico (JUNGES, 2010), sendo *Beauveria bassiana* alvo de diversos estudos e comercializado como inseticida atualmente.

As principais etapas do ciclo de infecção são: a adesão do esporo sobre a cutícula de um hospedeiro suscetível, a germinação do esporo e a formação do apressório na extremidade da hifa, a penetração do fungo através das camadas da cutícula do inseto (ARRUDA et al., 2005) onde as hifas entram no hospedeiro por orifícios naturais, ferimentos ou atravessando o exoesqueleto por degradação enzimática (ALVES, 1998). Na sequência, ocorre a colonização do interior do inseto (conidiogênese), que normalmente morre pela ação de toxinas liberadas pelo fungo e, por fim, há a liberação de hifas pelos demais orifícios do inseto e regiões frágeis da cutícula, havendo proliferação do micélio por todo corpo do hospedeiro. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, esporos são liberados e dispersos no ambiente, reiniciando o ciclo de infecção em outros indivíduos (ALVES, 1998). As enzimas desempenham um papel importante durante o processo de penetração do fungo no hospedeiro, principalmente nas duas primeiras fases de infecção (adesão e germinação), ao degradar a cutícula do inseto-alvo e invadir seu interior. A Figura 1 mostra uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) do processo de infecção por *Beauveria bassiana* no cupim subterrâneo *Heterotermes tenius*, uma das principais pragas da cana-de-açúcar e eucalipto no Brasil (MOINO JR, 2002).

Figura 1- Processo de infecção pelo fungo *B. bassiana*



Fonte: (MOINO JR, 2002).

### 3.3 PANORAMA NO BRASIL

Sendo o Brasil líder mundial no setor do agronegócio, essa liderança acarreta em uma dependência de insumos importados, dentre eles, agrotóxicos sintéticos, levando o país também a liderança mundial no consumo desses produtos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Brasil é responsável pelo consumo de 19% dos agrotóxicos produzidos no mundo (ECODEBATE, 2012). Neste cenário surge o controle biológico no Brasil, como componente do MIP, que vem ganhando espaço nos últimos anos.

#### 3.3.1 Controle Biológico no Brasil

O primeiro programa brasileiro de controle microbiano, em ampla escala, surgiu no início da década de 1970, com a utilização do fungo *M. anisopliae* para controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* na região Nordeste do país (ALVES, 1998) e de *Beauveria bassiana* para controle de *Cosmopolites sordidus*, o moleque-da-bananeira (PARRA et al., 2002). O primeiro alcançou resultados que permitiram reduzir 90% da área tratada com inseticidas sintéticos e o uso de insetos parasitoides para controle biológico da broca da cana-de-açúcar (ALVES, 1998). Até então, os primeiros produtos microbiológicos seguiam a legislação vigente com as mesmas exigências dos químicos. Entretanto, devido à normatização internacional e à inquietação de pesquisadores e gestores, procurou-se atualizar estas normas (OLIVEIRA-FILHO; FARIA; CASTRO, 2004).

Assim, em 1997, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) cria a Portaria Normativa Nº 131, a qual estabelece “procedimentos adotados para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes biológicos empregados no controle de uma população ou de atividades biológicas de outro organismo vivo considerado nocivo, visando à defesa fitossanitária” (BRASIL, 1997). Em 2008, após dez anos da regulamentação, surgiu a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCbio) com o objetivo de promover e estimular o controle biológico como uma técnica avançada e eficiente. Atualmente, a entidade conta com 25 empresas associadas que disponibilizam ao mercado produtos biopesticidas microbiológicos e macrobiológicos nos estados do Rio

Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, tendo mais de 100 marcas de bio defensivos registrados (ABC BIO, 2015).

### 3.3.2 Uso de fungos para controle biológico no Brasil

Na produção de orgânicos, os fungos têm um papel importante, pois são considerados “produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica” e a Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 12 de julho de 2013 estabelece suas especificações de referência (BRASIL, 2013). Na Tabela 1 são apresentadas estas especificações para a agricultura orgânica.

Tabela 1- Lista de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica

Agente biológico	Alvo biológico/ Cultura	Classe de uso
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (cigarrinha-da-raiz)/ cana-de-açúcar; <i>Zulia entreriana</i> (cigarrinha-das-pastagens)/ pastagens; <i>Deois flavopicta</i> (cigarrinha-das-pastagens; cigarrinha-dos-capinzais)/ pastagens de capim-braquiária.	Inseticida microbiológico
<i>Trichoderma stromaticum</i>	<i>Moniliophthora perniciosa</i> (vassoura de bruxa do cacauero)/ cacau.	Fungicida microbiológico
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Bemisia tabaci</i> (mosca-branca)/ soja e pepino; <i>Cosmopolites sordidus</i> (moleque da bananeira)/ bananeira; <i>Tetranychus urticae</i> (ácaro)/ morango; <i>Dalbulus maidis</i> (cigarrinha do milho)/ milho.	Inseticida e acaricida microbiológico
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> (nematóide das galhas)/ alface.	Nematicida microbiológico

Fonte: (BRASIL, 2013).

Das 25 indústrias que compõem a ABCbio, com mais de 100 marcas no total, 33 têm como ingrediente ativo um fungo, dentre eles, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma stromaticum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Metarhizium anisopliae* (ABCbio, 2016).

A produção em massa de fungos entomopatogênicos normalmente é realizada utilizando como substrato o arroz cozido. Após a colonização do arroz pelo microrganismo, a mistura arroz e fungo é triturada e comercializada na forma de pó-molhável. Esta mistura também pode ser vendida sem trituração, ficando a tarefa de separar o fungo do substrato, para remoção dos esporos, a cargo do produtor rural (DE FARIA; MAGALHÃES, 2001).

### 3.4 *BEAUVERIA BASSIANA* COMO INSETICIDA

Entre os agentes microbianos com atividade entomopatogênica, os pertencentes à ordem Hypocreales são os mais utilizados e o anamórfico (em que sua reprodução sexuada é ausente ou ocorre raramente) é o mais explorado. Por serem anamórficos, os insetos são infectados por conídios (propágulos assexuados) que se ligam à cutícula do hospedeiro. O fungo age por contato sobre seus hospedeiros, onde os conídios ou esporos funcionam como unidades infectivas e constituem o ingrediente ativo dos micoinseticidas (PEREIRA; MARTINS, 2016), germinando em um ambiente com alta umidade (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994). Micoinseticidas são produtos a base de propágulos vivos de fungos visando o controle de pragas através de aplicações inundativas ou inoculativas (MASCARIN et al., 2018). Uma infecção bem sucedida depende também das atividades enzimáticas para a degradação de proteínas, quitina e lipídios no tecido do inseto (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994).

*Beauveria bassiana* é o agente de biocontrole mais utilizado contra artrópodes, pois tem a capacidade de produzir estruturas de infecção e sintetizar um coquetel de proteínas, enzimas, ácidos orgânicos (principalmente ácido oxálico, que enfraquece a integridade da cutícula de insetos) e metabólitos secundários bioativos, que são responsáveis pela atividade entomopatogênica e pela virulência (GARCIA-ESTRADA; CAT; SANTAMARTA, 2016). A espécie foi descoberta por Agostino Bassi, em 1835, que constatou que o fungo era causador da “moscardina”, uma doença que atacava e matava as larvas do bicho-da-seda (MASCARIN; JARONSKI,

2016). Este fungo é comercializado desde 1965 na antiga União Soviética para controle de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) impulsionando, desde então, o avanço tecnológico nas áreas de produção e formulação de fungos entomopatogênicos em escala industrial. *B. bassiana*, atualmente, é empregado em escala comercial em países como Estados Unidos e México. Grandes volumes foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café, além de um volume menor ter sido destinado ao controle de cochonilhas (MICHEREFF-FILHO et al., 2007). Atualmente, oito marcas comerciais utilizam *B. bassiana* em suas formulações (ABC BIO, 2016). Diversos estudos vêm sendo realizados na área para seleção de isolados mais eficientes, formulação de produtos, melhoramento genético, produção de enzimas, entre outros, visando o controle de pragas. Por ter uma elevada variabilidade genética, este fungo se adapta às diferentes condições ambientais e também ataca com sucesso diversas populações de insetos (PIRES, 2007).

Dalla Santa et al. (2005) avaliaram a produção de conídios *B. bassiana* por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais. O fungo também foi utilizado para estudar o controle de diferentes pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), tendo resultados promissores. Dalla Santa et al. (2009) avaliaram a produção de conídios em fermentação em estado sólido para controle das lagartas *Thelosia camina* e *Hylesia sp*, obtendo até 97% de mortalidade das pragas, enquanto que Borges et al. (2011) avaliaram a capacidade de *B. bassiana* para controle de *Hedypathes betulinus*, também na erva-mate obtendo elevada eficiência no controle. Kang et al. (2005) estudaram a produção de conídios para controle de *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas), Pham, Kim e Kim (2010) fizeram o estudo para controle de *Myzus persicae* (pulgão-do-pessegueiro), Cafarchia et al. (2015) para o controle de *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato) e Kumar et al. (2016) no controle de *Sinoxylon anale* (escaravelho). Todos os trabalhos demonstraram que o fungo é altamente virulento para as pragas avaliadas.

Em relação ao estudo da produção de enzimas degradadoras de parede celular, este é o fator de virulência mais estudado em fungos entomopatogênicos (DIAS, 2005). O conhecimento das enzimas produzidas pelo fungo é de fundamental importância visto que estas tem um papel substancial na etapa de penetração e servem como estratégia para formulação de produtos (MASCARIN; JARONSKI,

2016). Um exemplo é a incorporação de determinadas enzimas extracelulares, produzidas no sobrenadante de culturas de fermentação líquidas, no produto formulado. Kim e Je (2010) precipitaram quitinase do sobrenadante de culturas de *Beauveria bassiana* e obtiveram excelente atividade inseticida contra pulgões de algodão, na tentativa de eliminar problemas associados ao longo período de tempo e o progresso lento no combate às pragas, características da aplicação de fungos entomopatogênicos. Um estudo similar foi realizado por Svedese et al. (2013) que visou avaliar a patogenicidade do fungo contra *D. saccharalis*, investigar a produção de quitinases e proteases, além de sua relação com a mortalidade das pragas. Atividades enzimáticas específicas degradadoras de cutículas (proteases e quitinases) correlacionaram-se positivamente com parâmetros de virulência de *B. bassiana* (SVEDESE et al., 2013). Dias (2005) estudou a produção de proteases e a patogenicidade contra a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e seus resultados sugerem que estas proteases são induzidas por componentes específicos da cutícula da broca. A produção de proteases e moléculas tóxicas (beauvericin, beauvericin A e bassianolide) também foi estudada como fator de virulência contra larvas de *Tenebrio molitor* e, embora sua produção esteja correlacionada com uma diminuição do tempo médio de sobrevivência das larvas, o método foi insuficiente para determinar a virulência de cepas de *B. bassiana* (CITO et al., 2016).

### 3.5 BEAUVERIA BASSIANA COMO ENDÓFITO

O termo “endófito” refere-se a organismos que vivem dentro de vegetais sem causar aparentes infecções em seus tecidos. Entre as plantas terrestres, os fungos endófitos são onipresentes, visto que diversas espécies de plantas abrigam pelo menos uma espécie de endófito fúngico e muitas espécies de plantas podem estar associadas a dezenas ou centenas destas espécies. Dentro dos hospedeiros, os endófitos fúngicos podem habitar todos os tecidos disponíveis, incluindo folhas, pecíolos, caules, galhos, cascas, xilemas, raízes, frutas, flores e sementes (ARNOLD, 2005).

Estes fungos têm um papel importante no controle biológico de patógenos das plantas, visto que estes podem ter a capacidade de reduzir a atividade de uma doença ou a sobrevivência de patógenos. Existem diversos mecanismos de controle biológico contra patógenos de plantas, tais como a antibiose ou amensalismo,



competição e parasitismo, onde o organismo de controle biológico é diretamente envolvido (OWNLEY; GWINN; VEGA, 2010). A antibiose é uma interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação. A competição é a interação entre organismos que tem o mesmo objetivo em comum, ocorrendo principalmente por busca de alimentos, espaço e oxigênio. O parasitismo é um fenômeno em que um microrganismo se nutre das estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do outro (MICHEREFF; MARIANO, 1993). Porém, utilizando outros mecanismos de controle biológico, como a indução de resistência sistêmica (estímulo dos mecanismos de defesa do hospedeiro pela introdução de organismos não patogênicos e/ou seus metabólitos e/ou linhagens fracas ou avirulentas do patógeno) e o aumento da resposta ao crescimento, a colonização pelo organismo de biocontrole desencadeia respostas na planta que reduzem ou aliviam as doenças (OWNLEY; GWINN; VEGA, 2010). A colonização de plantas por fungos endófitos pode ser localizada ou sistêmica. A colonização sistêmica pode ser causada por fungos entomopatogênicos e atuar contra a doença das plantas e a colonização localizada pode aumentar a produção de compostos fenólicos e outros metabolitos de defesa nas plantas (AZADI; SHIRZAD; MOHAMMADI, 2016).

No Brasil, diversos produtos biológicos estão disponíveis para utilização, dentre eles, estirpes fracas de CTV (*Citrus tristeza virus*) para premunização contra a tristeza dos citros, estirpes fracas de PRSV-W (*Papaya ringspot virus-watermelon*) para premunização contra o mosaico da abobrinha, *Hansfordia pulvinata* para o controle do mal-das-folhas da seringueira, *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro, *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento, *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças, *Trichoderma* sp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea, sendo este último, o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e em outros países da América Latina (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Dentro deste contexto, *Beauveria* vem sendo reconhecida como endófito. Este papel foi observado pela primeira vez por Bing e Lewis (1992), que encontraram este fungo crescendo em hastes de milho, causando mortalidade considerável em larvas de *Ostrinia nubilalis*. O fungo colonizou as plantas e possivelmente influenciou sua fotossíntese.

*B. bassiana* vem mostrando capacidade de inibir o crescimento de vários fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA et al., 2010). A eficiência de sua patogenicidade é comprovada contra *Rhizoctonia solani* e *Pythium myriotylu*, patógenos do tomateiro e algodoeiro (OWNLEY et al., 2008; AZADI; SHIRZAD; MOHAMMADI, 2016), contra *Fusarium oxysporum* (CULEBRO-RICALDI et al., 2017) também patógeno do tomateiro, contra *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma* (LOZANO-TOVAR et al., 2013, LOZANO-TOVAR et al., 2017) e *Phytophthora inundata* (LOZANO-TOVAR et al., 2013), patógenos da oliveira. Senthilraja et al. (2010) estudaram a eficiência de *B. bassiana* para combater *Sclerotium rolfsii*, praga do amendoim, utilizando um produto comercial com algumas modificações. *B. bassiana* mostrou-se eficiente no combate aos fungos patógenos devido ao fato de produzir enzimas de caráter antifúngico tais como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, que catalisam a hidrólise da quitina e  $\beta$ -1,3-glucana, respectivamente, constituintes da parede celular de fungos. A atividade antifúngica dessas proteínas é alcançada através de diversos mecanismos, incluindo a degradação do polímero de parede celular, a formação de poros (ou canal) através da membrana celular e inativação de ribossomos (HONG; MENG, 2003). Em alguns fungos a estrutura de quitina pode ser protegida por uma série de proteínas, conferindo ao fungo resistência a quitinases e há também fungos que não podem ser inibidos por quitinases isoladamente. Nestes casos, o efeito de quitinases pode depender da associação a  $\beta$ -1,3-glucanases ou outras substâncias antifúngicas (AGUSTINHO, 2007). Porém os mecanismos endofíticos de *Beauveria* ainda não são claros, sendo que em muitos casos, a proteção das plantas não foi acompanhada de morte manifesta por micoses. O que garante sua eficiência é, também, a produção de uma série de metabólitos conhecidos, tais como oosporeína, bassianolides, beauvericin, tenellin, bassianin e ácido oxálico (MASCARIN; JARONSKI, 2016).

### 3.6 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Enzimas são macromoléculas proteicas responsáveis pela aceleração de reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais (HAMÚ, 2007) e constituem o principal alvo da pesquisa em biotecnologia devido ao seu fundamental desempenho nos mecanismos celulares e a seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais e de interesse industrial (DO

CANTO; MENEZES, 1995). O termo “enzimas hidrolíticas” se refere ao conjunto de proteínas que catalisam reações de hidrólise de proteínas específicas e são utilizadas em controle biológico. O emprego de enzimas em produtos e processos industriais é inofensivo à saúde humana e animal e não causa danos ao meio ambiente. São facilmente degradadas e assimiladas pela cadeia alimentar, não contaminam lençóis freáticos e não são carcinogênicas. Ainda, graças à sua especificidade, evitam que extremos de temperatura, pH e pressão sejam usados nos processos industriais, economizando energia, equipamentos e deixando de expor trabalhadores a condições de trabalho perigosas (SAID; PIETRO, 2004). Para sua classificação, cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (*Enzyme Commission*), constituído de quatro dígitos, onde o primeiro indica a classe, seguido da subclasse, grupos químicos específicos que participam da reação e, finalmente, a enzima propriamente dita. Fungos entomopatogênicos são amplamente estudados por ser fonte de uma ampla gama de enzimas com bioatividade contra uma grande variedade de pragas. Estas enzimas produzidas são metabólitos secundários, compostos orgânicos que não desempenham um papel direto no crescimento e metabolismo dos fungos. Algumas destas enzimas importantes são quitinases, celulases, proteases e lipases (SANDHU et al., 2017) e degradam a parede celular das pragas-alvo.

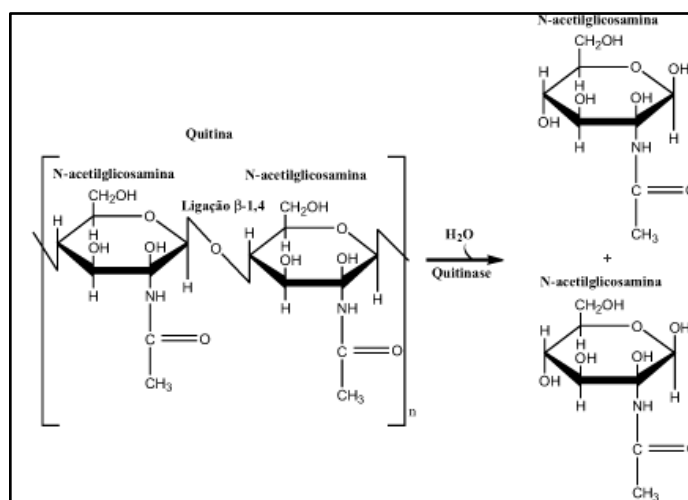
A parede celular é uma estrutura presente em vegetais, fungos e algumas bactérias e protozoários. Tem funções de proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva, promove rigidez e transporte de nutrientes, proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular (FLEURI, 2006). Esta estrutura, em vegetais, compreende camadas de microfibrilas de celulose ancoradas a uma matriz de hemicelulose, pectinas, entre outras moléculas menos abundantes. Já a parede celular de bactérias é composta por peptidoglicano, um complexo de proteínas e oligossacarídeos. Fungos tem a sua parede celular composta principalmente por quitina, o mesmo polissacarídeo que compõe a cutícula de caranguejos, lagostas e alguns insetos. Enzimas como quitinases, proteases, celulases e glucanases comprometem a estrutura destes organismos, degradando-as e afetando suas funções vitais (LODISH et al., 2014).

### 3.6.1 Quitinase

As quitinases são enzimas que degradam o polímero de quitina (Figura 2), amplamente encontradas na natureza, sendo produzidas por diversos organismos, tanto procariontes como eucariontes, onde neste último grupo, destacam-se os fungos (RUSTIGEL, 2014). Nos últimos anos, esta enzima têm recebido grande atenção devido a sua ampla gama de aplicações biotecnológicas, especialmente no controle biológico de fungos fitopatógenos e insetos (THANGADURAI; SANGEETHA, 2016).

Dependendo dos produtos de hidrólise da quitina e os padrões de clivagem, as quitinases podem ser classificadas em duas classes: Endoquitinases ou Quitodextrinases (EC 3.2.1.14) e Exoquitinases ou N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (EC 3.2.1.52). As primeiras degradam a quitina em qualquer ponto ao longo do polímero, formando produtos de diversos tamanhos, multímeros como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. Já as exoquitinases clivam a partir da extremidade não redutora da cadeia polimérica e liberam dímeros de N-acetil-D-glicosamina. Ainda, existem aquelas enzimas que não podem ser diferenciadas em exo ou endoquitinases, pois, possuem modo de clivagem tanto como exoquitinase como de endoquitinase (HAMÚ, 2007; THANGADURAI; SANGEETHA, 2016).

Figura 2- Hidrólise da quitina por uma quitinase

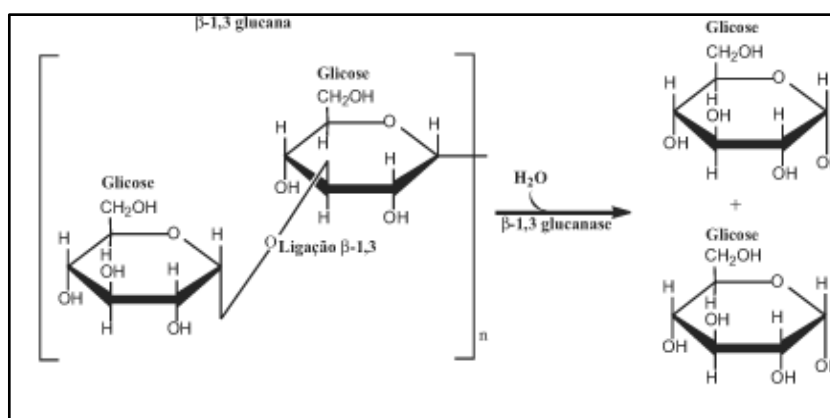


Fonte: (FLEURI, 2006).

### 3.6.2 $\beta$ -1,3-Glucanase

$\beta$ -1,3-glucanases possuem caráter antifúngico, sendo responsáveis pela degradação da sua estrutura micelial e são também os elementos chave no antagonismo entre fungos, o que lhes atribui um enorme potencial para o controle biológico (HONG; MENG, 2003). Estas enzimas degradam o polímero  $\beta$ -1,3- glucana (Figura 3) sendo classificadas de acordo com o seu modo de ação em duas classes: exo- $\beta$ -1,3-glucanase e endo- $\beta$ -1,3-glucanase. A exo- $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.58) hidrolisa unidades de glucana das extremidades não redutoras do polímero de glucana tendo conseqüentemente a glicose como produto da hidrólise. As endo  $\beta$ -1,3-glucanases ou laminarinases (EC 3.2.1.39) são capazes de clivar, aleatoriamente, ligações  $\beta$ -1,3 internas do polímero de glucana, liberando pequenos oligossacarídeos. Em fungos que degradam polímeros de glucanas, mais especificamente as  $\beta$ -1,3- glucanas, estas duas enzimas atuam sinergicamente, com diferentes modos de ação (PITSON; SEVIOUR; MCDUGALL, 1997).

Figura 3- Hidrólise da  $\beta$ -1,3-glucana por uma  $\beta$ -1,3-glucanase



Fonte: (FLEURI, 2006).

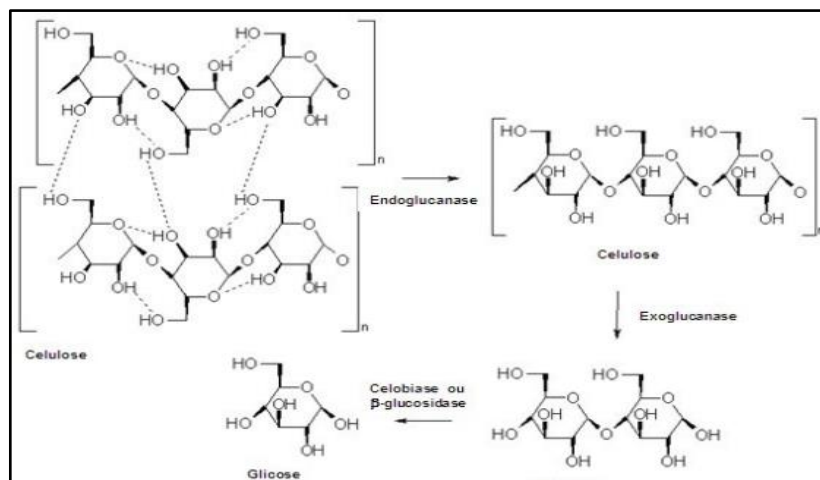
### 3.6.3 Celulases

Celulases são multienzimas complexas que hidrolisam o polímero de celulose em açúcares solúveis, principal composto de células vegetais. Este processo envolve a ação de um conjunto de enzimas denominado complexo celulase (DOS SANTOS et al., 2011) ou sistema celulolítico e sua atividade é sinérgica, isto é, a atividade combinada do complexo enzimático é maior do que a soma da atividade

individual de cada componente (DAROIT, 2007; SINGHANIA et al., 2017). Este complexo é dividido em três grupos: Endocelulases, Exocelulases e  $\beta$ -glicosidades (Figura 4).

A endoglucanase (EC 3.2.1.4) também é conhecida por Avicelase,  $\beta$ -1,4-glucanase, Carboximetilcelulase, Endo-1,4-  $\beta$ -D-glucanase ou celodextrinase é capaz de clivar as ligações internas nas regiões amorfas da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das mesmas e, assim, gerando novas extremidades livres na cadeia (DAROIT et al., 2007; PEREIRA, 2013). São as responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização da celulose, além de liberar oligossacarídeos: um redutor e um não redutor (DOS SANTOS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2017). A Exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91) age de maneira progressiva nas extremidades redutoras (CBHI) ou não redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando em seus produtos glicose e moléculas de celobiose (DE MARCO, 2012; PEREIRA, 2013). A Celobiase ou  $\beta$ -glicosidases (BGL) (EC 3.2.1.21) atua nos celooligossacarídeos e celobiose liberados pela ação das endo e exoglucanases e os hidrolisam a glicose (DE MARCO, 2012). Esta enzima é a responsável pelo produto final: monômeros de glicose. A maior parte das celulases produzidas por fungos filamentosos são limitadas pela quantidade de BGL. Esta enzima é um fator limitante na ação geral da celulase devido a sua propriedade de sensibilidade à glicose, sendo inibida pelo seu próprio produto final (glicose) e, mais importante ainda, é inibida pelo seu próprio substrato, celobiose (SINGHANIA et al., 2017).

Figura 4: Hidrólise da celulose por exocelulase, endocelulase e celobiase



Fonte: (FARINAS, 2011).

### 3.7 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS

A produção de enzimas por processos fermentativos pode ser realizada através de uma fermentação submersa (FS) ou em estado sólido (FES). Na fermentação em estado sólido o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a matriz sólida está a um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células, mas que não exceda a capacidade de ligação da água da matriz sólida (SCHMIDELL et al., 2001).

A água livre não parece ser o meio natural para a maioria dos microrganismos, pois nem mesmo os microrganismos marinhos preferem nadar na água do mar livre. Mais de 98% dos isolados do meio marinho são obtidos a partir das superfícies subaquáticas de substratos sólidos e menos de 1% de todos os fungos conhecidos foram encontrados em habitats marinhos (HÖLKER; HÖFFER; LENZ, 2004).

A fermentação em estado sólido está se expandindo com uma importância crescente, nas duas últimas décadas, para a produção de produtos de alto valor agregado, por exemplo, enzimas, de subprodutos agroindustriais (BEHERA; RAY, 2016). Tem a vantagem de apresentar maior taxa de reação devido ao contato direto entre o microrganismo e o substrato, utilizar substratos simples que precisam somente adição de água ou pequenas correções do meio, ter melhores taxas de aeração e menores riscos de contaminação por outros microrganismos. Ainda, as

condições de fermentação podem ser similares às naturais, podendo apresentar rendimentos superiores em relação a fermentação submersa e, devido a pouca quantidade de água utilizada, o produto encontra-se mais concentrado, reduzindo custos. Porém, o meio sólido dificulta a dissipação de calor e gases oriundos de processos de fermentação gerando uma heterogeneidade do substrato e causando dificuldades no controle de variáveis como temperatura, umidade, aeração e crescimento de microrganismos (SCHMIDELL et al., 2001).

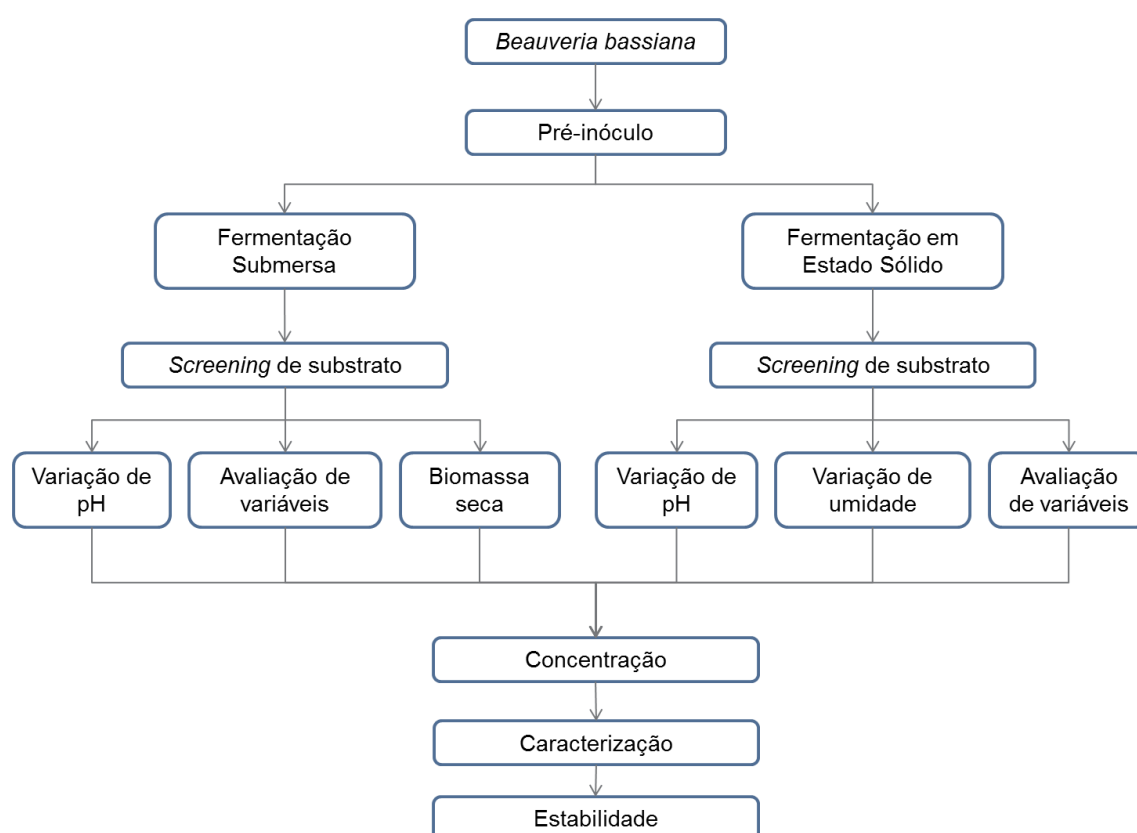
Por outra parte, a fermentação submersa se caracteriza pela utilização de um meio de cultivo líquido. Em comparação à fermentação em estado sólido, os processos submersos são mais fáceis de ser manipulados, oferecem maiores volumes de meio, permitem uma maior uniformidade da temperatura e distribuição de nutrientes e microrganismos no meio, bem como a facilidade de controle de variáveis. A absorção de nutrientes e excreção de metabólitos é mais eficiente, resultando em um menor tempo de fermentação e maior produtividade (MONTEIRO; SILVA, 2009). Porém, se o produto de interesse é extracelular, faz-se necessária uma etapa posterior de concentração do produto, o que ocasiona gastos adicionais ao processo, além de uma maior possibilidade de contaminação por microrganismos indesejados.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção é apresentada e descrita a metodologia experimental e analítica utilizada para a realização dos ensaios, bem como os materiais necessários para sua execução. A Figura 5 apresenta um fluxograma da metodologia experimental deste trabalho. A partir dos esporos de *B. bassiana* foi preparado o pré inóculo para as fermentações (sólida e submersa). Em seguida foi realizado um *screening* de substrato e a avaliação das variáveis em cada processo. Para a FS ainda foi avaliada a variação de pH e a biomassa seca. Já para a FES, além da avaliação das variáveis, foi estudada a variação de umidade e pH. Após a etapa de fermentação, as enzimas produzidas foram concentradas, caracterizadas, além de serem avaliadas em relação à sua estabilidade térmica e ao pH. Em paralelo aos três últimos ensaios foi avaliada, também, a atividade biológica do caldo enzimático produzido e concentrado.

Figura 5- Fluxograma da metodologia experimental



#### 4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO

O isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* foi cedido pelo Instituto Biológico do estado de São Paulo. A cepa foi mantida, inicialmente, em meio BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petri. Os repiques foram feitos transferindo um disco de BDA contendo o fungo, de diâmetro aproximadamente de 20 mm, para placas de Petri com meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por dez dias. Após o crescimento na placa de Petri, uma alçada de fungo foi transferida para tubo Falcon contendo meio BDA. Os tubos foram incubados em estufa a 28°C por dez dias e logo armazenados em geladeira.

#### 4.2 OBTENÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

Para o pré-inóculo, um tubo Falcon de 15 mL foi armazenado em estufa a 28°C por 24 horas. Na sequência, o fungo previamente inoculado em meio BDA foi transferido, com auxílio de uma alça de platina, para um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio BD (batata e dextrose) e solução de nutrientes (2 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1 g.L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O e 1 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (SOUZA et al., 2015), sendo armazenado em estufa a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, este volume foi transferido a um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do mesmo meio, completando assim, 100 mL de solução de BD, nutrientes e células de *B. bassiana*. O pré-inóculo foi incubado em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44) a 120 rpm e 28°C por três dias. Os meios de crescimento (BD e BDA), bem como os utensílios utilizados no processo foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1atm por 20 minutos.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Este item aborda as etapas executadas no cultivo de *B. bassiana* em fermentação submersa para obtenção do caldo enzimático. O primeiro passo foi a seleção do substrato que permitisse a maior produção de enzimas. Escolhido o meio de cultivo, parâmetros da fermentação foram avaliados através de um planejamento de experimentos. Dos dados do planejamento foram estudados, além da atividade enzimática, a produção de biomassa e a variação de pH no início e fim do processo

fermentativo. Os meios de fermentação bem como os utensílios utilizados em todas as etapas do processo foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

#### 4.3.1 *Screening* de substrato em FS

Na seleção do meio de fermentação mais adequado foram testadas diferentes substratos (Tabela 2). Avaliaram-se diferentes concentrações e combinações de sacarose, bagaço de malte, farelo de arroz, quitina de caranguejo moída e água de maceração de milho (AMM). O substrato considerado mais adequado foi aquele que garantiu a maior atividade das quatro enzimas.

Tabela 2- *Screening* de substrato para fermentação submersa

Teste	Composição
T1	Sacarose (100g/L)
T1'	Sacarose (100g/L) + AMM (10g/L)
T2	Quitina (10g/L) + Sacarose (30g/L)
T2'	Quitina (10g/L) + Sacarose (30g/L) + AMM (10g/L)
T3	Bagaço malte (60g/L) + Sacarose (10g/L)
T3'	Bagaço malte (60g/L) + Sacarose (10g/L) + AMM (10g/L)
T4	Farelo arroz (60g/L) + Sacarose (10g/L)
T4'	Farelo arroz (60g/L) + Sacarose (10g/L) + AMM (10g/L)

O cultivo de *B. bassiana* por fermentação submersa foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL, durante sete dias, em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44). Fixou-se um pH inicial de 6,5, agitação de 150 rpm e temperatura de 28°C. Foram inoculados 10 mL de pré inóculo em 90 mL do substrato correspondente em todos os Erlenmeyers.

#### 4.3.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FS

O estudo das variáveis na atividade de quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endo e exocelulases foi realizado por meio de um planejamento de experimentos. Os ensaios T1 e T2 foram selecionados para a etapa de avaliação das variáveis. Foi

definida uma temperatura de 28°C, agitação de 150 rpm, tempo de fermentação de sete dias e porcentagem de inóculo de 10% (v/v) para todos os ensaios. Um planejamento experimental Plackett & Burman com doze ensaios mais três pontos centrais foi delineado para identificar as variáveis que influenciaram no processo de produção de enzimas. O pH do meio foi ajustado utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH 1M) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M). Na Tabela 3 são apresentadas as variáveis estudadas bem como os níveis de cada fator (variável). Todos os experimentos, exceto o ponto central (o qual foi feito em triplicata) foram realizados em duplicata.

Tabela 3- Matriz do planejamento Plackett & Burman com 12 ensaios, variáveis codificadas e reais (entre parênteses).

Ensaio	pH	Extrato de levedura (%)	Nutrientes (%)	Quitina (%)	Sacarose (%)
1	1 (6)	-1 (2)	1 (1)	-1 (0)	-1(40)
2	1 (6)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	-1 (40)
3	-1 (4)	1 (6)	1 (1)	-1 (0)	1 (100)
4	1 (6)	-1 (2)	1 (1)	1 (10)	-1 (40)
5	1 (6)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	1 (100)
6	1 (6)	1 (6)	1 (1)	-1 (0)	1 (100)
7	-1 (4)	1 (6)	1 (1)	1 (10)	-1 (40)
8	-1 (4)	-1 (2)	1 (1)	1 (10)	1 (100)
9	-1 (4)	-1 (2)	-1 (0)	1 (10)	1 (100)
10	1 (6)	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (100)
11	-1 (4)	1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (40)
12	-1 (4)	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (40)
13	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	0 (5)	0 (70)
14	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	0 (5)	0 (70)
15	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	0 (5)	0 (70)

### **4.3.3 Obtenção do caldo enzimático**

Após a fermentação, o caldo enzimático foi separado da biomassa fúngica por centrifugação (Eppendorf, modelo 5804R) a 4000 rpm, por cinco minutos a 20°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em tubos Falcon de 50 mL e o sólido, utilizado para avaliação da biomassa seca.

### **4.3.4 Obtenção da biomassa seca**

O sedimentado resultante do processo de centrifugação foi disposto em placas de Petri e seco em estufa a 101°C por 24 horas. Visto que o sedimentado continha não só massa fúngica, mas também quitina, um sólido insolúvel, a massa da mesma foi descontada do valor total para o cálculo da biomassa seca.

### **4.3.5 Avaliação do pH final**

O pH ao final da fermentação foi avaliado utilizando um pHmetro (Digimed, modelo DM-22) , devidamente calibrado. O valor de pH final foi comparado ao inicial para avaliar sua variação durante o processo fermentativo.

## **4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Primeiramente, foram realizados ensaios para definir qual o melhor substrato para fermentação baseado na maior atividade de enzimas. Logo, prosseguiu-se para um estudo dos parâmetros do processo utilizando o substrato selecionado na etapa anterior e variando-se diversos fatores que poderiam ter influência na síntese. Nesta etapa foram avaliadas a atividade das quatro enzimas, além do pH e umidade final do meio. Os meios de fermentação, bem como os utensílios utilizados em todo o processo, foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

### **4.4.1 Screening de substrato em FES**

Na Tabela 4 estão apresentados os substratos avaliados na fermentação em estado sólido. Foram testados arroz branco tipo I e resíduos industriais tais como bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz, suplementados com AMM (fonte de

nitrogênio) e farelo de soja (para conferir maior aeração ao meio). Além dos substratos apresentarem diferentes fontes de nutrientes, outras características como a aeração, o tamanho de partícula de substrato e a área superficial também variam. Estas características afetam não só a produção de enzimas, mas também o crescimento do fungo, a transferência de massa e a troca gasosa (KARTHIK et al., 2014). O processo foi conduzido em frascos cilíndricos, de vidro, fechados e de aproximadamente 10 cm de diâmetro, durante dez dias, em estufa a 28°C. A umidade inicial foi ajustada em 65% e a concentração de inóculo em 10% para todas as fermentações.

Tabela 4- Seleção do substrato para fermentação em estado sólido

Teste	Composição
1	Arroz Puro
2	Arroz + 10% AMM (m/m)
3	Arroz + 10% FS (m/m)
4	BC Puro
5	BC + 10% AMM (m/m)
6	BC + 10% FS (m/m)
7	FA Puro
8	FA + 10% AMM (m/m)
9	FA + 10% FS (m/m)

AMM=Água de maceração de milho; FS=Farelo de soja; BC=Bagaço de cana-de-açúcar; FA=Farelo de arroz.

#### 4.4.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FES

Visando avaliar a atividade de quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endo e exocelulases, um planejamento de experimentos Plackett & Burman com oito ensaios mais três pontos centrais foi delineado (Tabela 5). Foram utilizados 30 g de substrato para todos os ensaios e as variáveis estudadas foram: umidade e concentrações de inóculo, solução de nutrientes e  $\text{CaCO}_3$ . A temperatura foi fixada em 25°C e um tempo de fermentação de dez dias para todos os ensaios. Testes

anteriores indicaram que a temperatura não é um fator significativo na atividade enzimática em uma faixa próxima à estipulada (de 25 a 35°C). Os mesmos testes indicaram que há maior atividade enzimática mas em umidade baixa e a baixas concentrações de inóculo, justificando a escolha das faixas das variáveis. O reagente  $\text{CaCO}_3$  foi adicionado ao meio de fermentação para regular o pH. Todos os experimentos, exceto o ponto central (o qual foi feito em triplicata) foram realizados em duplicata.

Tabela 5- Matriz do planejamento Plackett & Burman com 8 ensaios

Ensaio	H	%I	%N	%CaCO <sub>3</sub>
1	1 (60)	-1 (5)	-1 (0)	1 (2)
2	1 (60)	1 (15)	-1 (0)	-1 (0)
3	1 (60)	1 (15)	1 (1)	-1 (0)
4	-1 (40)	1 (15)	1 (1)	1 (2)
5	1 (60)	-1 (5)	1 (1)	1 (2)
6	-1 (40)	1 (15)	-1 (0)	1 (2)
7	-1 (40)	-1 (5)	1 (1)	-1 (0)
8	-1 (40)	-1 (5)	-1 (0)	-1 (0)
9	0 (50)	0 (10)	0 (0,5)	0 (1)
10	0 (50)	0 (10)	0 (0,5)	0 (1)
11	0 (50)	0 (10)	0 (0,5)	0 (1)

H = umidade do meio, % I = concentração de inóculo, %N = concentração da solução de nutrientes.

#### 4.4.3 Obtenção do caldo enzimático

O caldo enzimático foi obtido pela extração com água destilada foi adicionada ao meio sólido na proporção 1:5 e os frascos foram submetidos à agitação de 150 rpm por 60 minutos em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44). O caldo enzimático foi separado da massa sólida através de filtração com gaze e armazenado em geladeira para análises posteriores.

#### 4.4.4 Avaliação da umidade final

A umidade ao final da fermentação foi calculada pela Equação 1, sendo o meio de fermentação homogeneizado após o fim da fermentação e uma alíquota de aproximadamente 1 g de massa de substrato úmido foi pesada e transferida a uma placa de Petri. O conjunto foi levado para secagem em estufa a 101°C por 24 horas e pesado novamente. A variação de peso antes e após o processo de secagem indica a massa de água presente no meio, utilizada para o cálculo da umidade final (Equação 1).

$$H_{final} = \frac{\text{massa de substrato úmido}}{\text{massa de água}} \quad (1)$$

#### 4.4.5 Avaliação do pH inicial e final

O meio de fermentação já esterilizado, mas sem inocular, foi extraído através do mesmo procedimento especificado no item 4.4.3 para avaliação do pH inicial. Para avaliar o pH final, o caldo enzimático proveniente do processo de fermentação e posterior extração foi utilizado para avaliar o pH final. Para isto, foi utilizado um pHmetro (Digimed, modelo DM-22), devidamente calibrado.

### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXOCELULASE

A atividade total de exocelulase foi determinada segundo a metodologia de Ghose (1987) com algumas modificações. Para a reação foi utilizada uma solução 1% (v/v) de celulose microcristalina como substrato. Foram adicionados 250 µL do substrato, 10 µL de caldo enzimático e 240 µL de tampão acetato 50mM pH 5 para diluição. A mistura foi incubada durante 30 minutos a 50°C e em seguida resfriada em banho de água gelada para interromper a reação.

O açúcar redutor liberado (glicose) foi quantificado através do método DNS utilizando uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto, por grama de substrato seco (para a FES) ou por mL de meio (para FS).



#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOCELULASE

A atividade total de endocelulase foi determinada segundo a metodologia de Ghose (1987). Para a reação foi utilizada uma solução 2% (v/v) de carboximetilcelulose (CMC, grau de substituição= 0,7) como substrato. Foram adicionados 250  $\mu$ L do substrato, 10  $\mu$ L de caldo enzimático e 240 $\mu$ L de tampão acetato 50 mM pH 5 para diluição. A mistura foi incubada durante 30 minutos a 50°C e em seguida resfriada em banho de água gelada para interromper a reação.

O açúcar redutor liberado (glicose) foi quantificado através do método DNS utilizando uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, por grama de substrato seco (para a FES) ou por mL de meio (para FS).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE B-1,3-GLUCANASE

A atividade total de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada seguindo a metodologia de Jiang et al. (2016), cujo procedimento consiste na adição de 90  $\mu$ L de solução de laminarina 1 % a 10  $\mu$ L de caldo enzimático e 400  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50mM pH 5 para diluição. A mistura reacional foi incubada a 45°C por 30 minutos e após colocada em banho de água gelada para interromper o processo.

O açúcar redutor liberado da laminarina (glicose) foi quantificado através do método do DNS, plotando-se uma curva padrão com glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol do açúcar redutor por minuto, por grama de substrato seco (no caso da FES) ou por mL de meio (no caso da FS).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE QUITINASE

A atividade total de quitinase foi determinada segundo a metodologia de Kim, Yang e Kim (2003) com algumas modificações. Como substrato, foi utilizada uma solução de quitina de caranguejo moída na concentração de 5 % em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5. Foram adicionados 250  $\mu$ L desta solução a 10  $\mu$ L de caldo enzimático e 240  $\mu$ L do mesmo tampão acetato para diluição. O meio reacional foi incubado em banho maria a 37°C por 1 h e após colocado em banho de água gelada para interromper a reação.

O açúcar redutor liberado (N-acetilglucosamina) foi quantificado através do método do DNS e, para isto, foi traçada uma curva padrão de N-acetilglucosamina. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina por minuto, por grama de substrato seco (no caso da FES) ou, por mL de meio (no caso da FS).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Para determinar a concentração dos açúcares redutores correspondentes de cada reação enzimática, foi utilizado o método do DNS proposto por Miller (1959). O método baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (MILLER, 1959).

Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) ao produto da reação enzimática mantida a 100°C por 5 minutos. A reação foi interrompida por banho de gelo e em seguida adicionados 8 mL de solução de tartarato de sódio e potássio. Para o branco, o caldo enzimático foi substituído por tampão acetato 50 mM pH 5. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV2600) a 540nm para todas as amostras utilizando a curva padrão correspondente ao produto liberado da reação.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Para determinação de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), por ser um método colorimétrico altamente sensível, linear e rápido. O ensaio de Bradford baseia-se nas interações entre os resíduos de aminoácidos com o corante "Comassie blue" (G-250) numa matriz ácida. A ligação do corante as proteínas resulta em uma mudança espectral para a forma azul do corante (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas totais foi determinada pela adição de 5 mL do reagente de Bradford a 20  $\mu\text{L}$  de caldo enzimático e 80  $\mu\text{L}$  de água destilada para diluição da amostra. Para o branco, o caldo enzimático foi substituído por água destilada. A mistura foi agitada e, após 10 minutos repousada a temperatura ambiente, foi lida a absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu,

modelo UV 2600) em 595 nm. Para quantificação das proteínas foi utilizada uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA).

#### 4.11 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS

Após as etapas de produção de enzimas, uma etapa de concentração fez-se necessária. Esta etapa visou a redução do volume do produto em função de garantir uma concentração que certifique a eficiência de degradação dos polímeros pelas respectivas enzimas, sem a necessidade de se obter um produto com alto grau de pureza. Os estudos sobre concentração de enzimas, geralmente envolvem uma etapa prévia de precipitação com sulfato de amônio, seguida de diálise. Eventualmente, quando o objetivo é a purificação destas enzimas, adicionam-se etapas como ultrafiltração e/ou cromatografia. Este trabalho buscou avaliar a eficiência da concentração, pela execução de uma etapa apenas e comparando os resultados com os da literatura.

Os ensaios foram realizados em um módulo de filtração tubular, de aço inoxidável, com capacidade de 500 mL, acoplado a um agitador magnético e banho termostático para manutenção da temperatura. Nitrogênio gasoso foi utilizado como força motriz para a permeação da solução através da membrana, cuja pressão foi regulada por um manômetro.

As membranas já cortadas foram previamente acondicionadas em água destilada por 24 horas. Com exceção do último ensaio (de reutilização da membrana), todos os tratamentos foram realizados com membranas novas. Foram avaliadas três variáveis, seguindo a ordem: tipo de membrana, pressão e proporção entre permeado e retido. Ainda, foi estudada a capacidade de reutilização da membrana. A permeabilidade da água foi avaliada, através da inclinação da curva do fluxo de permeado em função da pressão nos ensaios de estudo da pressão, proporção e reutilização. A eficiência da ultrafiltração em todas as etapas foi avaliada pelo fator de purificação (FP), expresso na Equação 2.

$$FP = \frac{\text{Atividade específica da enzima concentrada (U.mg}^{-1}\text{)}}{\text{Atividade específica do extrato bruto (U.mg}^{-1}\text{)}} \quad (2)$$

Onde, a atividade específica corresponde a atividade total, determinada anteriormente pelo método do DNS, por miligrama de proteína.

#### 4.11.1 Tipo de membrana

Inicialmente, três membranas de ultrafiltração (Microdyn-Nadir) foram testadas, como apresentado na Tabela 6. Todos os tratamentos nesta etapa foram conduzidos a 25°C, 2 bar e a proporção entre permeado e retido foi de 1:1 (50% permeado e 50% retido).

Tabela 6- Características das membranas

Membrana	UP010	UH050	US100
Material da membrana	PES	PESH	PSUH
Material de apoio	PE/PP	PE/PP	PE/PP
MWCO nominal (kDa)	10	50	100
Espessura (µm)	210-250	210-250	210-250

MWCO- *Molecular weight cut-off*

PE- Polietileno

PES- Polietersulfona

PESH- Polietersulfona hidrofílica

PP- Polipropileno

PSUH- Polisulfona

#### 4.11.2 Pressão de trabalho

A membrana selecionada foi avaliada em diferentes pressões (2, 4 e 6 bar). O efeito da temperatura não foi estudado devido à elevada sensibilidade das enzimas frente à temperatura e sua provável desnaturação durante o processo. Todos os tratamentos nesta etapa foram conduzidos a 25°C e uma proporção de permeado e retido de 1:1.

#### 4.11.3 Proporção entre permeado e retido

Escolhida a melhor membrana, na melhor condição de pressão, foi avaliada a proporção entre permeado e retido que garantisse a maior concentração de enzimas. Para isto, três ensaios foram realizados, sendo eles: 75% permeado e 25%

retido (3:1), 50% permeado e 50% retido (1:1) e 25% permeado e 75% retido (1:3). Nesta etapa, a permeabilidade da água foi avaliada antes e após o processo de ultrafiltração para verificar a queda no fluxo e a possibilidade de reutilizar a membrana.

#### **4.11.4 Reutilização da membrana**

Finalmente, um estudo sobre a viabilidade de reutilização da membrana foi realizado. Esta etapa é importante para reduzir custos do processo. Para isto, primeiramente mediu-se a permeabilidade da água antes do processo de ultrafiltração, logo se filtrou o caldo enzimático nas condições que apresentaram melhores resultados nos ensaios anteriores. Foi realizada uma rápida lavagem do sistema com água destilada e em seguida a permeabilidade foi medida novamente através da variação do fluxo com a pressão.

A seguir, uma limpeza oxidante da membrana foi realizada utilizando uma solução de hipoclorito de sódio  $2000 \text{ mg.L}^{-1}$ . A solução de limpeza permaneceu em contato com a membrana no próprio módulo de filtração durante 30 minutos, a  $40^\circ\text{C}$  e sem pressurização do sistema. Em seguida, a solução foi descartada, lavando-se o módulo com água destilada e a membrana foi reutilizada.

#### **4.12 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CONCENTRADAS**

Visando realizar uma caracterização bioquímica das quatro enzimas estudadas, foram analisadas as condições ótimas de temperatura e pH, bem como seus efeitos na atividade enzimática. Para isto, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Foram estabelecidos dois níveis lineares (T e pH), quatro pontos axiais e três repetições do ponto central, totalizado 11 ensaios. A Tabela 7 apresenta a matriz experimental com os valores reais e codificados. As respostas avaliadas foram as atividades enzimáticas de endocelulase, exocelulase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase. Para isto, a reação enzimática foi conduzida sob diferentes condições de temperatura e pH, utilizando-se os mesmos substratos e tempos de reação descritos anteriormente para cada enzima (itens 4.5 a 4.9 deste trabalho). O pH foi ajustado utilizando soluções de tampão acetato conforme definido no delineamento experimental.

Tabela 7- Matriz experimental do DCCR

Ensaio	T(°C)	pH
1	-1 (24,4)	-1 (4,3)
2	1 (45,6)	-1 (4,3)
3	-1 (24,4)	1 (5,7)
4	1 (45,6)	1 (5,7)
5	-1,41 (20)	0 (5)
6	1,41 (50)	0 (5)
7	0 (35)	-1,41 (4)
8	0 (35)	1,41 (6)
9	0 (35)	0 (5)
10	0 (35)	0 (5)
11	0 (35)	0 (5)

#### 4.13 ESTABILIDADE DE ENZIMAS

As enzimas concentradas no processo de ultrafiltração foram avaliadas quanto à sua estabilidade em diferentes temperaturas e pH. Para isto, alíquotas de enzimas foram incubadas a 20, 30 e 40°C e em pH de 4, 5 e 6 por um período máximo de 168 horas. Para análise dos dados foram construídas curvas de atividade enzimática relativa de cada enzima em função do tempo. A atividade enzimática relativa é uma razão entre a atividade da enzima submetida a determinado processo (de variação de temperatura ou pH) e a atividade enzimática no início desse processo, em termos de porcentagem.

Também foi realizado um estudo da cinética de inativação das enzimas. A inativação das enzimas usualmente segue uma cinética de primeira ordem, conforme mostra a Equação 3. A constante de inativação de primeira ordem, (k) foi determinada a partir do coeficiente angular quando relacionamos  $\ln (A/A_0) \times t$  (TOLEDO, 2007). Onde (A) é a atividade da enzima após a inativação e (A<sub>0</sub>) é a atividade inicial da enzima.

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \cdot t \quad (3)$$

Os resultados dos experimentos térmicos foram avaliados através do parâmetro cinético tempo de redução decimal (D). O valor D é o tempo pelo qual uma amostra deve ser mantida a uma dada temperatura de modo a reduzir a atividade enzimática a um décimo do seu valor inicial ou o tempo necessário para reduzir a atividade inicial em 90% e matematicamente é expresso pela Equação 4 (TOLEDO, 2007).

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (4)$$

#### 4.13.1 Estabilidade Térmica

O caldo enzimático concentrado foi incubado em banho maria a temperaturas próximas às de campo (20, 30 e 40°C). Amostras foram retiradas durante 168 horas ou até a atividade enzimática ser reduzida a aproximadamente 50% do valor inicial. Os ensaios foram realizados em duplicata e expressos em termos de atividade relativa.

#### 4.13.2 Estabilidade ao pH

O caldo enzimático concentrado foi diluído em pH 4, 5 e 6, na proporção 1:1 e incubado em banho maria a 30°C. Amostras foram retiradas durante 168 horas ou até a atividade enzimática ser reduzida a aproximadamente 50% do valor inicial. Os ensaios foram realizados em duplicata e expressos em termos de atividade relativa.

#### 4.14 ATIVIDADE BIOLÓGICA

O efeito das enzimas sobre larvas de *Phereocera uterella* (traça-das-paredes) foi avaliado. Para isto, as frações de permeado e retido obtidas no processo de ultrafiltração foram aplicadas em placas de Petri contendo cinco traças cada uma. Foram aplicados 10 e 20 µL de cada fração em traças pequenas e grandes. O controle constituiu na aplicação de água destilada e as placas foram monitoradas

diariamente por 168 horas. A mortalidade das larvas foi avaliada visualmente. Durante todo o processo, as placas foram mantidas no escuro a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

#### 4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de verificar o efeito dos fatores analisados na atividade enzimática (variável resposta), tanto nos planejamentos Placket & Burman PB12 e PB8 quanto no DCCR deste trabalho, foi realizada uma análise estatística. Os delineamentos PB foram utilizados devido a um grande número de variáveis serem estudadas simultaneamente, enquanto que o DCCR foi utilizado para verificar a significância de um menor número de variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

No caso dos delineamentos PB12 e PB8, a significância estatística foi avaliada através do p-valor, com intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ). No delineamento experimental DCCR o tratamento dos dados foi o mesmo, com a diferença de ser usado um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Para a significância da regressão, verificando se existe uma relação de linearidade entre a variável resposta e a variável independente, o teste F foi utilizado. Assim, para valores de  $F_{\text{calc}}$  maiores ao  $F_{\text{tab}}$  o modelo é significativo. Ainda, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi utilizado para avaliar a qualidade do ajuste dos modelos estimados, medindo o percentual da variação total da variável dependente em estudo que é explicada pelo modelo. Assim, quanto mais próximo da unidade o valor de  $R^2$ , maior será a validade da regressão (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statistica 10.0.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão apresentados os principais resultados obtidos neste trabalho. O mesmo inicia com o estudo da produção de enzimas hidrolíticas via fermentação submersa e em estado sólido, seguida de sua concentração, avaliação da temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH. Ainda apresentar-se-ão resultados da atividade biológica do caldo enzimático concentrado.

### 5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Este item contém os resultados referentes à fermentação submersa. Primeiramente é apresentado o resultado da seleção do melhor meio de fermentação, o qual foi utilizado na etapa de avaliação dos parâmetros da fermentação seguido da avaliação da biomassa seca e variação de pH.

#### 5.1.1 *Screening* de substrato em FS

O resultado da seleção do melhor meio de fermentação, baseado na maior atividade enzimática é apresentado na Tabela 8. Atividades enzimáticas mais elevadas foram obtidas no ensaio T1, para as quatro enzimas, composto somente por sacarose em uma concentração de  $100 \text{ g.L}^{-1}$ . O uso de água de maceração de milho (AMM) para o ensaio contendo apenas sacarose diminuiu consideravelmente a atividade das quatro enzimas (teste T1'). Por este motivo, AMM não foi utilizada em ensaios posteriores. Selecionaram-se para a seguinte etapa, os ensaios T1 e T2, este último, por conter quitina, poderia induzir a produção de quitinase, importante enzima de uso em biocontrole.

Tabela 8- Atividades enzimáticas da seleção de substrato na FS

Teste	Composição	ExoC (U.mL <sup>-1</sup> )	EndoC (U.mL <sup>-1</sup> )	β-1,3-G (U.mL <sup>-1</sup> )	Q (U.mL <sup>-1</sup> )
T1	S (100 g.L <sup>-1</sup> )	17,22	23,04	16,71	20,61
T1'	S (100 g.L <sup>-1</sup> ) + AMM (10 g.L <sup>-1</sup> )	8,29	6,48	7,87	4,54
T2	Quitina (10 g.L <sup>-1</sup> ) + S (30 g.L <sup>-1</sup> )	12,37	11,48	0,05	6,99
T2'	Quitina (10 g.L <sup>-1</sup> ) + S (30 g.L <sup>-1</sup> ) + AMM (10 g.L <sup>-1</sup> )	4,50	3,06	2,75	2,56
T3	BM (60 g.L <sup>-1</sup> ) + S (10 g.L <sup>-1</sup> )	4,07	2,91	2,79	1,46
T3'	BM (60 g.L <sup>-1</sup> ) + S (10 g.L <sup>-1</sup> ) + AMM (10 g.L <sup>-1</sup> )	5,07	3,15	2,47	1,81
T4	FA (60 g.L <sup>-1</sup> ) + S (10 g.L <sup>-1</sup> )	5,81	3,20	6,66	2,89
T4'	FA (60 g.L <sup>-1</sup> ) + S (10 g.L <sup>-1</sup> ) + AMM (10 g.L <sup>-1</sup> )	5,08	3,26	4,92	3,13

S=sacarose, AMM=água de maceração de milho, BM=bagaço de malte, FA=farelo de arroz, ExoC=exocelulase, EndoC=endocelulase, β-1,3-G=β-1,3-glucanase, Q=quitinase.

### 5.1.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FS

As atividades enzimáticas de endocelulase (EndoC), exocelulase (ExoC), β-1,3-glucanase (β-1,3-G) e quitinase (Q) são apresentadas na Tabela 9. A atividade de exocelulase variou de 4,05 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 11) até 22,23 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 8 e 9). A atividade de endocelulase variou de 0,82 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 7) até 21,83 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 9). A atividade de β-1,3-Glucanase variou de 1,80 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 7) até 21,94 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 9). Finalmente, a atividade de quitinase variou de 0,92 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 7) até 16,23 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 8).

Tabela 9- Matriz experimental (PB12) e respectivas atividades enzimáticas na FS

Ensaio	pH	%E.L.	%N	%Q	%S	ExoC (U.mL <sup>-1</sup> )	EndoC (U.mL <sup>-1</sup> )	β-1,3-G (U.mL <sup>-1</sup> )	Q (U.mL <sup>-1</sup> )
1	1(6)	-1(2)	1(1)	-1(0)	-1(40)	5,51	3,03	2,97	1,97
2	1(6)	1(6)	-1(0)	1(10)	-1(40)	4,44	2,03	2,83	1,10
3	-1(4)	1(6)	1(1)	-1(0)	1(100)	11,59	15,91	17,13	10,17
4	1(6)	-1(2)	1(1)	1(10)	-1(40)	7,27	2,63	4,21	1,95
5	1(6)	1(6)	-1(0)	1(10)	1(100)	17,32	12,87	17,21	10,41
6	1(6)	1(6)	1(1)	-1(0)	1(100)	16,99	14,96	15,88	10,55
7	-1(4)	1(6)	1(1)	1(10)	-1(40)	4,45	0,82	1,80	0,92
8	-1(4)	-1(2)	1(1)	1(10)	1(100)	22,23	20,48	20,14	16,23
9	-1(4)	-1(2)	-1(0)	1(10)	1(100)	22,23	21,83	21,94	15,02
10	1(6)	-1(2)	-1(0)	-1(0)	1(100)	20,67	19,33	15,94	10,67
11	-1(4)	1(6)	-1(0)	-1(0)	-1(40)	4,05	2,16	2,81	1,09
12	-1(4)	-1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(40)	7,63	3,87	5,39	2,59
13	0(5)	0(4)	0(0,5)	0(5)	0(70)	15,09	12,62	11,06	5,55
14	0(5)	0(4)	0(0,5)	0(5)	0(70)	15,85	11,93	11,53	5,91
15	0(5)	0(4)	0(0,5)	0(5)	0(70)	14,42	12,36	13,63	8,08

%E.L.=Extrato de levedura (g.L<sup>-1</sup>), %N=solução de nutrientes (v/v), %Q=quitina de caranguejo moída (g.L<sup>-1</sup>), %S = sacarose (g.L<sup>-1</sup>), ExoC=exocelulase, EndoC=endocelulase, β-1,3-G=β-1,3-glucanase, Q=quitinase.

Os ensaios 8 e 9 apresentaram os melhores resultados para a atividade das quatro enzimas e foram validados repetindo-se a condição de cada ensaio quatro vezes. Para a exocelulase, a média da atividade das réplicas no ensaio 8 foi de  $21,15 \pm 1,28$  U.mL<sup>-1</sup> e no ensaio 9 a média da atividade enzimática foi  $21,68 \pm 2,16$  U.mL<sup>-1</sup>. Para a endocelulase, a média da atividade das réplicas no ensaio 8 foi  $20,21 \pm 0,54$  U.mL<sup>-1</sup> e no ensaio 9 a média da atividade foi  $21,32 \pm 0,74$  U.mL<sup>-1</sup>. Para a β-1,3-glucanase, a média da atividade no ensaio 8 foi  $19,70 \pm 0,32$  U.mL<sup>-1</sup> e no ensaio 9 a média foi  $21,57 \pm 1,10$  U.mL<sup>-1</sup>. Para a quitinase, a média da atividade das réplicas no ensaio 8 foi  $15,16 \pm 0,67$  U.mL<sup>-1</sup> e no ensaio 9,  $14,91 \pm 0,59$  U.mL<sup>-1</sup>.

Em comparação a outros trabalhos realizados em fermentação submersa, mas com diferentes substratos e fungos, os resultados obtidos foram promissores. A

Tabela 10 aponta que as atividades enzimáticas de *B. bassiana* nas condições especificadas neste trabalho foram, na maioria dos casos, superiores aos resultados obtidos por outros autores. A concentração e tipos de sais e elementos traços utilizados em cada trabalho não foram especificados, quando utilizados, somente foi indicado o seu uso na composição do meio através da letra “N”.

A atividade das exocelulases produzidas por *B. bassiana* foi superior à de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* e à de *Neurospora sitophilia*. Já a atividade de endocelulase produzida por *B. bassiana* foi superior à produzida por *T. harzianum* e *N. sitophilia*, porém inferior à produzida por *T. reesei* e *T. asperellum*. As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase produzidas por *B. bassiana* foram superiores às produzidas por outros fungos e inclusive outros isolados de *B. bassiana*.

Tabela 10- Comparação da atividade enzimática em FS

Fungo	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )	Composição do meio	Fonte
<b>Exocelulase</b>			
<i>B. bassiana</i>	22,23	EL (2 g.L <sup>-1</sup> ), Q (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (100 g.L <sup>-1</sup> ).	Este trabalho
<i>T. harzianum</i>	5,6	S (5 g.L <sup>-1</sup> ), P (5 g.L <sup>-1</sup> ), CM (5 g.L <sup>-1</sup> )	(LIBARDI et al., 2017)
<i>N. sitophilia</i>	0,12	Pó de trigo (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (10 g.L <sup>-1</sup> ), G (20g.L <sup>-1</sup> ), N.	(LI; PENG; CHEN, 2013)
<i>T. reesei</i>	1	Switchgrass (1%), U (0,3g.L <sup>-1</sup> ), N	(WANG et al., 2017)
<i>T. asperellum</i>	1	Switchgrass (1%), N	(WANG et al., 2017)
<b>Endocelulase</b>			
<i>B. bassiana</i>	21,83	EL (2 g.L <sup>-1</sup> ), Q (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (100 g.L <sup>-1</sup> ).	Este trabalho
<i>T. harzianum</i>	14,4	S (5 g.L <sup>-1</sup> ), P (5 g.L <sup>-1</sup> ), CM (5 g.L <sup>-1</sup> )	(LIBARDI et al., 2017)
<i>N. sitophilia</i>	0,21	Pó de trigo (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (10 g.L <sup>-1</sup> ), G (20g.L <sup>-1</sup> ), N.	(LI; PENG; CHEN, 2013)
<i>T. asperellum</i>	27	Switchgrass (1%), U (0,3g.L <sup>-1</sup> ), N	(WANG et al., 2017)
<i>T. reesei</i>	30	Palha de arroz (1%), U (0,3 g.L <sup>-1</sup> ), N	(WANG et al., 2017)
<b>β-1,3-Glucanase</b>			
<i>B. bassiana</i>	21,94	EL (2 g.L <sup>-1</sup> ), Q (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (100 g.L <sup>-1</sup> ).	Este trabalho
<i>M. verrucaria</i>	0,19	EL (0,5 g.L <sup>-1</sup> ), Q (5 g.L <sup>-1</sup> ), BP(0,5 g.L <sup>-1</sup> ), U (0,3 g.L <sup>-1</sup> ), Fel de boi (1 g.L <sup>-1</sup> ), N.	(CHAVAN et al., 2017)
<i>B. rhodina</i>	2,30	G (10g.L <sup>-1</sup> ), N.	(GIESE et al., 2011)
<i>T. harzianum</i>	4,25	G (5 g.L <sup>-1</sup> ), L (5 g.L <sup>-1</sup> ), N.	(GIESE et al., 2011)
<b>Quitinase</b>			
<i>B. bassiana</i>	16,23	EL (2 g.L <sup>-1</sup> ), Q (10 g.L <sup>-1</sup> ), S (100 g.L <sup>-1</sup> ), N (1% v/v).	Este trabalho
<i>B. bassiana</i>	0,65	EL (0,5 g.L <sup>-1</sup> ), BP (0,5 g.L <sup>-1</sup> ), Q (5 g.L <sup>-1</sup> ), Azeite de oliva (5 mL.L <sup>-1</sup> ).	(DHAWAN; JOSHI, 2017)
<i>M. verrucaria</i>	1,7	EL (0,5 g.L <sup>-1</sup> ), Q (5 g.L <sup>-1</sup> ), U (0,3 g.L <sup>-1</sup> ), BP (0,5 g.L <sup>-1</sup> ), Fel de boi (1 g.L <sup>-1</sup> ), N.	(CHAVAN et al., 2017)

Q= quitina, EL= extrato de levedura, S= sacarose, N= solução de nutrientes, BP= bactopectona, G= glicose, L= lactose, P= peptona, CM= celulose microcristalina.

Os dados obtidos do planejamento Plackett & Burman foram submetidos à análise estatística, com intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ) para visualizar quais as variáveis que apresentaram efeito sobre a atividade da enzima. A Tabela 11 mostra a influência de cada fator (variáveis independentes) na atividade da enzima exocelulase (variável dependente). Observa-se que as concentrações de sacarose (%S) e a de extrato de levedura (%E.L.) tiveram influência significativa sobre a atividade de exocelulase em FS ( $p < 0,1$ ). As demais variáveis não afetaram significativamente a atividade enzimática. Os efeitos observados indicam que o aumento da concentração de sacarose bem como a diminuição da concentração de extrato de levedura conduziu a um aumento na atividade enzimática de exocelulase.

Tabela 11- Efeito das variáveis na atividade de exocelulase em FS

Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p-valor
Média	12,65	0,569	22,22	<0,0001
pH	0,00	1,273	0,00	0,9972
%E.L.	-4,45	1,273	-3,49	0,0068
%N	-1,38	1,273	-1,09	0,3056
%Q	1,92	1,273	1,51	0,1662
%S	12,94	1,273	10,17	<0,0001

%E.L.=Extrato de levedura, %N=solução de nutrientes, %Q=quitina de caranguejo moída, %S = sacarose.

A Tabela 12 apresenta a influência das variáveis independentes na atividade de endocelulase. Da mesma forma que para a exocelulase, a atividade enzimática de endocelulase foi positivamente afetada pelo aumento da concentração de sacarose e a diminuição de extrato de levedura ( $p < 0,1$ ).

Tabela 12- Efeito das variáveis na atividade de endocelulase em FS

Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p-valor
Média	10,46	0,451	23,20	<0,0001
pH	-1,70	1,008	-1,69	0,1255
%E.L.	-3,74	1,008	-3,71	0,0049
%N	-0,71	1,008	-0,71	0,4976
%Q	0,23	1,008	0,23	0,8220
%S	15,14	1,008	15,03	<0,0001

%E.L.=Extrato de levedura, %N=solução de nutrientes, %Q=quitina de caranguejo moída, %S = sacarose.

Na Tabela 13 é possível observar a influência dos fatores estudados na atividade de  $\beta$ -1,3-Glucanase. A concentração de sacarose e a de extrato de levedura tiveram efeitos significativos, sendo o primeiro efeito positivo e o último, negativo. O pH também apresentou efeito significativo negativo, indicando que uma diminuição da variável levou a um aumento na atividade enzimática. As demais variáveis não apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,1$ ).

Tabela 13- Efeito das variáveis na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em FS

Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p-valor
Média	10,96	0,359	30,56	<0,0001
pH	-1,70	0,802	-2,11	0,06366
%E.L.	-2,15	0,802	-2,69	0,02500
%N	-0,67	0,802	-0,83	0,4286
%Q	1,34	0,802	1,66	0,1304
%S	14,70	0,802	18,33	<0,0001

%E.L.=Extrato de levedura, %N=solução de nutrientes, %Q=quitina de caranguejo moída, %S = sacarose.

O efeito das variáveis independentes na atividade de quitinase (variável dependente) é mostrado na Tabela 14. Observou-se que o aumento da

concentração de sacarose e quitina no meio de fermentação tiveram efeitos positivos na atividade enzimática. O pH e o extrato de levedura tiveram efeitos significativos negativos sobre a atividade de quitinase, enquanto que a concentração de solução de nutrientes não possuiu efeito significativo ( $p < 0,1$ ), na faixa avaliada.

Tabela 14- Efeito das variáveis na atividade de quitinase em FS

Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p-valor
Média	6,81	0,305	22,36	<0,0001
pH	-1,56	0,681	-2,29	0,0478
%E.L.	-2,37	0,681	-3,47	0,0070
%N	0,15	0,681	0,22	0,8312
%Q	1,43	0,681	2,10	0,0648
%S	10,57	0,681	15,51	<0,0001

%E.L.=Extrato de levedura, %N=solução de nutrientes, %Q=quitina de caranguejo moída, %S = sacarose.

### 5.1.3 Biomassa seca e variação de pH

A concentração de biomassa de *B. bassiana* em cada ensaio do PB12 bem como a variação do pH durante o processo de fermentação são mostradas na Tabela 15. A maior concentração de biomassa ocorreu nas condições do ensaio 5 ( $26,54 \text{ g.L}^{-1}$ ), enquanto que a menor concentração ( $11,59 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu nas condições do ensaio 4, que corresponde também à maior variação de pH no processo fermentativo (2,31). O pH final variou de 3,25 (ponto central) até 4,46 (Ensaio 5). A menor variação de pH foi correspondente ao ensaio 9, onde houve uma diminuição de 4 para 3,79. As condições do ensaio 9 também foram as melhores para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase, endo e exocelulase. Assim, observa-se que maiores variações de pH conduziram a menores concentrações de biomassa, já as menores variações de pH conduziram a uma maior atividade enzimática.



Tabela 15- Concentração de biomassa fúngica e variação de pH na FS

Ensaio	Biomassa fúngica (g.L <sup>-1</sup> )	pH inicial	pH final
1	12,35	6	3,72
2	15,85	6	4,32
3	19,60	4	3,53
4	11,59	6	3,69
5	26,54	6	4,46
6	22,58	6	4,31
7	26,49	4	3,48
8	14,68	4	3,78
9	13,47	4	3,79
10	14,48	6	4,07
11	16,66	4	3,64
12	16,01	4	3,56
13	12,33	5	3,57
14	13,67	5	3,25
15	16,08	5	3,65

## 5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Este item contém os resultados referentes à fermentação em estado sólido. Primeiramente é apresentado o resultado da seleção do melhor meio de fermentação, o qual foi utilizado na etapa de avaliação dos parâmetros da fermentação seguida da avaliação da umidade final e variação de pH.

### 5.2.1 *Screening* de substrato em FES

A atividade enzimática das quatro enzimas avaliadas é apresentada na Tabela 16. Observa-se que a adição de AMM ao meio diminuiu a atividade das quatro enzimas, exceto para a atividade de exocelulase no teste 7, utilizando farelo de arroz como substrato. Exocelulase foi produzida em todos os substratos testados, tendo maior atividade utilizando bagaço de cana-de-açúcar puro e a menor

utilizando arroz suplementado com AMM. Para a endocelulase não houve atividade em todos os meios (bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de soja e farelo de arroz suplementado com AMM). O melhor resultado foi obtido utilizando somente arroz.  $\beta$ -1,3-Glucancases e quitinases tiveram atividade em todos os substratos, principalmente quando utilizado arroz puro. Sendo assim, o meio mais adequado foi o arroz tipo 1 puro.

Tabela 16- Atividades enzimáticas das enzimas em diferentes substratos na FES

Teste	Composição	ExoC (U.g <sup>-1</sup> )	EndoC (U.g <sup>-1</sup> )	$\beta$ -1,3-G (U.g <sup>-1</sup> )	Q (U.g <sup>-1</sup> )
1	Arroz Puro	42,54	17,18	16,71	18,04
2	Arroz + 10% AMM	16,79	0,31	0,16	0,82
3	Arroz+ 10% FS	32,10	0,19	0,16	0,82
4	BC Puro	44,20	6,93	6,41	4,56
5	BC + 10% AMM	20,17	3,90	4,93	2,51
6	BC + 10% FS	18,96	0,00	0,52	0,46
7	FA Puro	19,32	0,23	0,16	1,61
8	FA + 10% AMM	22,32	0,00	0,16	0,92
9	FA + 10% F.S	21,78	0,08	0,16	0,89

AMM=Água de maceração de milho; FS=Farelo de soja; BC=Bagaço de cana-de-açúcar; FA=Farelo de arroz.

### 5.2.2 Avaliação das variáveis na atividade enzimática em FES

A matriz experimental Plackett & Burman, com oito ensaios (PB8) e a média das atividades enzimáticas são apresentadas na Tabela 17. A atividade de exocelulase variou de 14,53 U.g<sup>-1</sup>(ensaio 7) até 46,78 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 5), a de endocelulase variou de 1,41 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 7) até 28,00 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 5). A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase variou de 3,03 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 8) até 26,79 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 5) e a atividade de quitinase variou de 0,95 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 8) até 16,16 U.g<sup>-1</sup> (ensaio 5).

De maneira geral, observou-se uma maior atividade de enzimas no meio sólido quando comparado ao submerso. A atividade de exocelulase aumentou 52,5%, a de endocelulase 22,0% e a de  $\beta$ -1,3-glucanase 18,1% no meio

fermentativo em estado sólido. Porém, a atividade de quitinase permaneceu a mesma nos dois processos estudados. Li, Peng e Chen (2013) afirmam que a maior secreção de proteínas e atividades enzimáticas na FES não pode ser totalmente atribuídas à maior produção de biomassa, embora esta não seja avaliada neste trabalho. A razão substancial pode ser que as propriedades fisiológicas dos fungos na FES são mais condutivas à expressão proteica e à secreção enzimática.

Tabela 17- Matriz experimental PB8 e respectivas atividades enzimáticas na FES

Ensaio	H	%I	%N	%CaCO <sub>3</sub>	ExoC (U.g <sup>-1</sup> )	EndoC (U.g <sup>-1</sup> )	β-1,3-G (U.g <sup>-1</sup> )	Q (U.g <sup>-1</sup> )
1	1(60)	-1(5)	-1(0)	1(2)	31,07	22,44	16,54	15,21
2	1(60)	1(15)	-1(0)	-1(0)	18,45	9,82	18,55	6,49
3	1(60)	1(15)	1(1)	-1(0)	15,16	12,19	20,29	7,98
4	-1(40)	1(15)	1(1)	1(2)	21,38	3,89	4,91	2,04
5	1(60)	-1(5)	1(1)	1(2)	46,78	28,00	26,79	16,16
6	-1(40)	1(15)	-1(0)	1(2)	17,46	3,10	5,07	2,44
7	-1(40)	-1(5)	1(1)	-1(0)	14,53	1,41	3,56	1,27
8	-1(40)	-1(5)	-1(0)	-1(0)	16,57	2,11	3,03	0,95
9	0(50)	0(10)	0(0,5)	0(1)	32,88	16,54	24,64	11,30
10	0(50)	0(10)	0(0,5)	0(1)	36,24	20,69	19,70	15,48
11	0(50)	0(10)	0(0,5)	0(1)	33,28	30,18	22,93	16,8

H = umidade do meio, %I = concentração de inóculo, %N = concentração de solução de nutrientes, %CaCO<sub>3</sub> = concentração de carbonato de cálcio.

O ensaio 5 apresentou os melhores resultados para a atividade das quatro enzimas e foram validados repetindo-se a condição de cada ensaio quatro vezes. Para a exocelulase, a média da atividade das foi  $44,10 \pm 1,29$  U.g<sup>-1</sup>. Para a endocelulase, a média da atividade das réplicas foi  $29,32 \pm 2,04$  U.g<sup>-1</sup>. Para a β-1,3-glucanase, a média da atividade das réplicas foi  $25,01 \pm 2,48$  U.mL<sup>-1</sup> e para a quitinase, a média da atividade das réplicas foi  $19,53 \pm 1,30$  U.mL<sup>-1</sup>.

A Tabela 18 apresenta uma comparação com outros trabalhos da literatura, realizados em fermentação em estado sólido, mas com diferentes substratos e fungos, os resultados aqui obtidos foram, na maioria dos casos, superiores.

Tabela 18- Comparação da atividade enzimática em FES

Fungo	Atividade enzimática (U.g <sup>-1</sup> )	Composição do meio	Fonte
Exocelulase			
<i>B. bassiana</i>	22,23	N (1% m/m), CaCO <sub>3</sub> (2% m/m),	Este trabalho
<i>N. sitophilia</i>	30,2	Palha de trigo, S (10% m/m), N	(LI; PENG; CHEN, 2013)
<i>T. reesei</i>	0,9	Resíduos de carnaúba	(DA SILVA et al., 2018)
<i>T. reesei</i>	13,4	Polpa de kinnow, P (100g.L <sup>-1</sup> ), Farelo de trigo (25% m/m), N	(OBEROI et al., 2010)
Endocelulase			
<i>B. bassiana</i>	28,00	N (1% m/m), CaCO <sub>3</sub> (2% m/m),	Este trabalho
<i>T. reesei</i>	25,2	Polpa de kinnow, P (100g.L <sup>-1</sup> ), Farelo de trigo (25% m/m), N	(OBEROI et al., 2010)
<i>T. reesei</i>	13,0	Resíduos de carnaúba	(DA SILVA et al., 2018)
<i>N. sitophilia</i>	30,2	Palha de trigo, S (10% m/m), N	(LI; PENG; CHEN, 2013)
β-1,3-Glucanase			
<i>B. bassiana</i>	26,79	N (1% m/m), CaCO <sub>3</sub> (2% m/m),	Este trabalho
<i>T. viride</i>	8,32	Bagaço de uva, sedimentos de vinho (43% m/m), P (0,4% m/m)	(ZHUI et al., 2008)
Quitinase			
<i>B. bassiana</i>	16,23	N (1% m/m), CaCO <sub>3</sub> (2% m/m)	Este trabalho
<i>T. asperellum</i>	3,31	Farelo de trigo, N	(KUMAR et al., 2012)
<i>T. longibrachiatum</i>	5,0	Farelo de trigo e quitina (9:1), N	(KOVACS et al., 2003)
<i>B. bassiana</i>	28,93	S, N, Cutícula de <i>Diatraea saccharalis</i>	(SVEDESE et al., 2013)
<i>T. viride</i>	47,8	Bagaço de uva, sedimentos de vinho (43% m/m), P (0,4% m/m)	(ZHUI et al., 2008)

N= nutrientes, P= peptona, CaCO<sub>3</sub>= carbonato de cálcio, S= sacarose.

A Tabela 18 mostra que as atividades de exocelulase foram superiores para *B. bassiana* em todos os casos. Para a endocelulase, a atividade enzimática foi inferior apenas à de *N. sitophilia* inoculada em palha de trigo. Estudos da atividade de β-1,3-Glucanase em FES são raros, porém a atividade desta enzima produzida

por *B. bassiana* mostrou-se aproximadamente três vezes superior à de *T. viride*, que utilizou resíduos da uva e do vinho como substrato. Porém, estas condições favoreceram a atividade de quitinase, que foi superior à obtida neste trabalho. A atividade de quitinase foi superior quando comparada a fungos e meios de cultivo diferentes, porém inferior quando comparada a outros isolados de *B. bassiana*, os quais foram fermentados em meios sólidos diferentes.

Visando identificar o efeito dos fatores estudados, os dados obtidos do planejamento PB8 foram submetidos à análise estatística, com intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,1$ ). A Tabela 19 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade de exocelulase (variável dependente). Observa-se que a umidade (H) foi a única variável que teve influência significativa na atividade da enzima ( $p < 0,1$ ), sendo que o aumento da umidade conduziu a um aumento da atividade enzimática. As demais variáveis não afetaram significativamente sua atividade, na faixa em estudo.

Tabela 19: Efeito das variáveis na atividade de exocelulase em FES

Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	14,87	2,300	6,467	0,0007
H	17,68	5,394	3,277	0,0169
%I	-3,28	5,394	-0,608	0,5656
%N	2,09	5,394	0,388	0,7115
%CaCO <sub>3</sub>	5,44	5,394	1,008	0,3524

H = umidade do meio, %I = concentração de inóculo, %N = concentração de solução de nutrientes, %CaCO<sub>3</sub> = concentração de carbonato de cálcio.

A Tabela 20 apresenta a influência das variáveis independentes na atividade de endocelulase. A umidade e a concentração de CaCO<sub>3</sub> tiveram efeitos significativos e positivos na atividade da enzima, indicando que um aumento destas variáveis conduziu ao aumento da sua atividade ( $p < 0,1$ ).

Tabela 20- Efeito das variáveis na atividade de endocelulase em FES

Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	26,49	2,237	11,84	<0,0001
H	12,27	5,247	2,34	0,0579
%I	-7,23	5,247	-1,38	0,2173
%N	5,47	5,247	1,04	0,3374
%CaCO <sub>3</sub>	11,10	5,247	2,12	0,0787

H = umidade do meio, %I = concentração de inóculo, %N = concentração de solução de nutrientes, %CaCO<sub>3</sub> = concentração de carbonato de cálcio.

Na Tabela 21 é possível observar a influência dos fatores estudados na atividade de  $\beta$ -1,3-Glucanase. Apenas a umidade (H) teve efeito significativo e positivo. As demais variáveis envolvidas não apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,1$ ).

Tabela 21- Efeito das variáveis na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em FES

Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	15,09	2,021	7,469	0,0003
H	16,40	4,739	3,460	0,0135
%I	-0,27	4,739	-0,057	0,9561
%N	3,09	4,739	0,652	0,5387
%CaCO <sub>3</sub>	1,97	4,739	0,415	0,6923

H = umidade do meio, %I = concentração de inóculo, %N = concentração de solução de nutrientes, %CaCO<sub>3</sub> = concentração de carbonato de cálcio.

O efeito das variáveis independentes estudadas na atividade de quitinase é mostrado na Tabela 22. Da mesma forma que para as demais enzimas, observou-se que o aumento da umidade (H) teve efeito positivo na atividade enzimática. As demais variáveis não possuíram efeitos significativos, independente de seu valor na faixa estudada.

Tabela 22- Efeito das variáveis na atividade de quitinase em FES

Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	9,34	1,338	6,979	0,0004
H	11,59	3,138	3,694	0,0102
%I	-1,85	3,138	-0,589	0,5774
%N	0,78	3,138	0,248	0,8125
%CaCO <sub>3</sub>	2,98	3,138	0,950	0,3789

H = umidade do meio, %I = concentração de inóculo, %N = concentração de solução de nutrientes, %CaCO<sub>3</sub> = concentração de carbonato de cálcio.

### 5.2.3 Umidade e pH finais

A Tabela 23 mostra a variação da umidade e do pH no início e ao final do processo fermentativo. Observa-se que a umidade variou menos de 20% em todos os casos e não houve considerável perda de umidade ao longo do processo. Nas condições do ensaio 5, além do pH inicial e final serem os mais elevados, a variação deste fator ao longo da fermentação foi uma das menores (variação de 1,87). Este ensaio coincidiu com a maior síntese de enzimas, da mesma forma que na fermentação submersa, onde menores variações de pH foram associadas à maior atividade enzimáticas. Os ensaios 7 e 8, cujas atividades enzimáticas foram as mais baixas (Tabela 17), apresentaram baixas variações de pH ao longo do processo (1,50 e 1,71 respectivamente), porém seus valores iniciais e finais foram relativamente baixos.

Tabela 23- Variação de umidade (H) e pH em FES

Ensaio	H inicial	H final	Variação de H	pH inicial	pH final
1	60	71,12	11,12	8,34	5,90
2	60	70,29	10,29	6,47	5,26
3	60	71,75	11,75	7,19	5,21
4	40	55,23	15,23	7,93	5,99
5	60	68,41	8,41	8,42	6,55
6	40	57,53	17,53	7,97	6,41
7	40	53,48	13,48	6,70	5,20
8	40	51,60	11,60	6,66	4,95
9	50	63,67	13,67	7,64	4,75
10	50	65,38	15,38	7,66	4,59
11	50	61,89	11,89	7,69	5,05

### 5.3 CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS

Este item contém o resultado dos ensaios realizados na escolha da melhor membrana e condições de trabalho para se obter um concentrado de enzimas. Ainda, apresenta os resultados sobre a possibilidade de reutilização da membrana realizando-se uma limpeza oxidante no sistema após cada uso.

#### 5.3.1 Seleção da membrana

As Tabelas 24 a 27 apresentam os resultados de atividade total, proteína total, atividade específica e fator de purificação de cada enzima nas frações de permeado e retido, para as três membranas testadas (UP010, UH050 e US100). A pressão e temperatura foram mantidas fixas a 2 bar e 25°C, respectivamente.

É possível observar pela Tabela 24 que, para as três membranas avaliadas a atividade total de exocelulase foi mais elevada na fração retida, porém a atividade específica da enzima foi superior no permeado. Isto se deve ao fato de que uma quantidade maior de proteína total foi retida pelas três membranas, o que ocasionou a diminuição da atividade específica nesta fração. Por consequência, o fator de



purificação foi superior nas frações de permeado. A membrana UP010, de menor MWCO (10 kDa) foi a que melhor conseguiu concentrar exocelulase.

Tabela 24- Concentração de exocelulase em três membranas diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Membrana	Ext. bruto	9,12	0,027	337,78	
UP010	Permeado	3,62	0,004	905,00	2,68
	Retido	5,92	0,046	128,70	0,38
UH050	Permeado	5,31	0,012	442,50	1,31
	Retido	6,54	0,036	181,67	0,54
US100	Permeado	5,62	0,012	468,33	1,39
	Retido	6,53	0,031	210,65	0,62

Para a endocelulase (Tabela 25), nas membranas UP010 e UH050, a maior atividade enzimática total encontrou-se no retido, já na houve uma maior atividade enzimática total no permeado. Porém, concentrações maiores de proteína total encontradas no retido resultaram em atividades específicas e fatores de purificação superiores no permeado e a UP010, apresentou os melhores resultados.

Tabela 25- Concentração de endocelulase em três membranas diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Membrana	Ext. bruto	2,87	0,027	106,30	
UP010	Permeado	2,05	0,004	512,50	4,82
	Retido	2,43	0,046	52,83	0,50
UH050	Permeado	2,13	0,012	177,50	1,67
	Retido	2,61	0,036	72,50	0,68
US100	Permeado	2,28	0,012	190,00	1,79
	Retido	2,10	0,031	67,74	0,64

Da mesma forma que para a endocelulase, atividades totais maiores de  $\beta$ -1,3-glucanase foram encontradas na fração retida das membranas UP010 e UH050 e na fração permeada da membrana US100 (Tabela 26). Porém, também ocorreu uma maior concentração de proteína total no retido, para as três membranas, que resultou em um fator de purificação superior no permeado. Novamente, a membrana UP010 apresentou os melhores resultados para a purificação de  $\beta$ -1,3-glucanase.

Tabela 26- Concentração de  $\beta$ -1,3-glucanase em três membranas diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Membrana	Ext. bruto	2,75	0,027	101,85	
UP010	Permeado	1,94	0,004	485,00	4,76
	Retido	2,38	0,046	51,74	0,51
UH050	Permeado	1,47	0,012	122,50	1,20
	Retido	2,53	0,036	70,28	0,69
US100	Permeado	4,54	0,012	378,33	3,71
	Retido	2,09	0,031	67,42	0,66

Para a quitinase, o resultado não foi diferente dos anteriores. Atividades específicas e fatores de purificação superiores foram encontrados nas frações de permeado (Tabela 27) e a membrana UP010 foi a que teve maior capacidade de concentração da enzima.

Tabela 27- Concentração de quitinase em três membranas diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Membrana	Ext. bruto	1,38	0,027	51,11	
UP010	Permeado	1,56	0,004	390,00	7,63
	Retido	1,51	0,046	32,83	0,64
UH050	Permeado	1,72	0,012	143,33	2,80
	Retido	1,90	0,036	52,78	1,03
US100	Permeado	1,10	0,012	91,67	1,79
	Retido	1,41	0,031	45,48	0,89

### 5.3.2 Pressão de trabalho

A membrana UP010 foi selecionada para continuação dos estudos, visto que apresentou os melhores fatores de purificação para as quatro enzimas avaliadas. Nas Tabelas 28, a 31 estão apresentados os resultados para as pressões avaliadas.

Observa-se pela Tabela 28 que independentemente da pressão, a atividade específica de exocelulase foi maior no permeado. Fatores de purificação maiores também foram encontrados no permeado, como consequência. Ainda, observa-se que a pressão de 4 bar foi a que propiciou a melhor concentração da enzima. O aumento da pressão de 2 bar, utilizada no ensaio anterior, para 4 bar praticamente triplicou o fator de purificação. Na pressão de 6 bar, o fator de purificação diminuiu em torno de duas vezes.

Tabela 28- Concentração de exocelulase em três pressões diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Pressão	Ext. bruto	9,12	0,028	325,71	
2 bar	Permeado	1,48	0,002	740,00	2,27
	Retido	4,13	0,035	118,00	0,36
4 bar	Permeado	2,02	0,001	2020,00	6,20
	Retido	8,04	0,063	127,62	0,39
6 bar	Permeado	5,06	0,006	843,33	2,59
	Retido	3,57	0,065	54,92	0,17

A Tabela 29 apresenta os resultados para a endocelulase. A pressão que garantiu o maior fator de purificação foi a de 4 bar, sendo ele aproximadamente 2,3 vezes maior que na condição utilizada inicialmente (2 bar). Na pressão de 6 bar, a eficiência da membrana foi inferior.

Tabela 29- Concentração de endocelulase em três pressões diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Pressão	Ext. bruto	3,03	0,028	108,21	
2 bar	Permeado	1,66	0,002	830,00	7,67
	Retido	2,44	0,035	69,71	0,64
4 bar	Permeado	1,95	0,001	1950,00	18,02
	Retido	2,76	0,063	43,81	0,40
6 bar	Permeado	2,70	0,006	450,00	4,16
	Retido	2,80	0,065	43,08	0,40

Na concentração de  $\beta$ -1,3-glucanase (Tabela 30), mais uma vez a pressão de 4 bar garantiu a melhor concentração da enzima. O fator de purificação aumentou cerca de 2,3 vezes quando comparado à condição dos ensaios iniciais (2 bar), enquanto que na pressão de 6 bar houve um decréscimo da eficiência.

Tabela 30- Concentração de  $\beta$ -1,3-glucanase em três pressões diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Pressão	Ext. bruto	2,71	0,028	96,79	
2 bar	Permeado	1,89	0,002	945,00	9,76
	Retido	2,84	0,035	81,14	0,84
4 bar	Permeado	2,16	0,001	2160,00	22,32
	Retido	3,10	0,063	49,21	0,51
6 bar	Permeado	2,40	0,006	400,00	4,13
	Retido	2,71	0,065	41,69	0,43

Da mesma forma que para as demais enzimas, a concentração de quitinase utilizando uma pressão de 4 bar foi a mais eficiente (Tabela 31). O fator de purificação foi aproximadamente duas vezes superior ao fator na pressão utilizada nos ensaios anteriores (2 bar). Já em pressões mais elevadas (6 bar) a eficiência foi menor quando comparada aos ensaios iniciais, diminuindo o fator de purificação em torno de cinco vezes em relação ao ensaio de 4 bar.

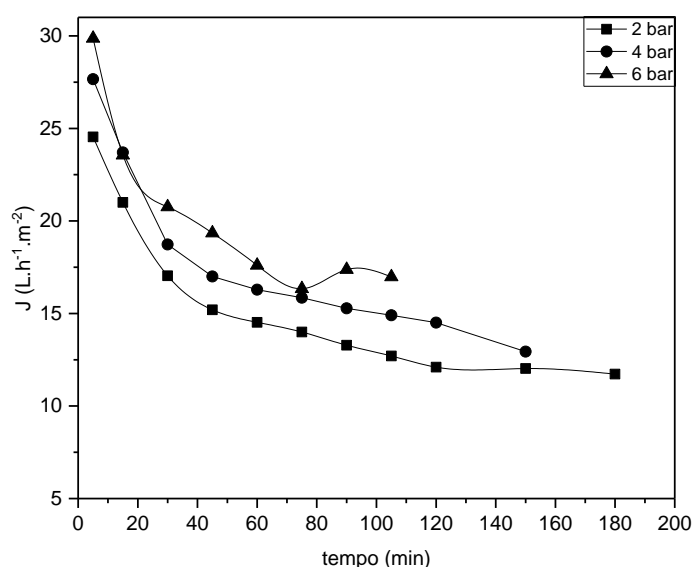
Tabela 31- Concentração de quitinase em três pressões diferentes

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Pressão	Ext. bruto	1,26	0,028	45,00	
2 bar	Permeado	1,31	0,002	655,00	14,56
	Retido	1,91	0,035	54,57	1,21
4 bar	Permeado	1,13	0,001	1130,00	25,11
	Retido	1,29	0,063	20,48	0,46
6 bar	Permeado	1,31	0,006	218,33	4,85
	Retido	1,69	0,065	26,00	0,58

A permeabilidade à água das membranas utilizadas foram de 62,55, 59,57 e 64,54 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> para os ensaios de 2, 4 e 6 bar, respectivamente. As pequenas

diferenças na permeabilidade das três membranas são explicadas pela heterogeneidade do material que as compõem. A Figura 6 mostra a variação de fluxo de permeado do extrato bruto com o tempo para as três pressões estudadas. As curvas apresentaram o comportamento esperado para os processos de separação por membranas. Em um momento inicial ocorreu uma rápida queda no fluxo de permeado e logo em seguida uma redução mais lenta devido à deposição de solutos na superfície da membrana. Em pressões mais baixas, devido à força motriz ser menor, a redução do fluxo foi mais gradual e o tempo de filtração aumentou. Já com o aumento da pressão, a queda do fluxo inicial se acentuou e os tempos de filtração foram mais curtos. Flutuações no fluxo de permeado observam-se na curva de 6 bar devido à formação de bolhas de ar no canal de saída do permeado. A utilização da pressão de 4 bar assegurou um fluxo de permeado mais uniforme ao longo do processo, sem a formação de bolhas de ar e com um tempo de filtração moderado, quando utilizada a proporção de 1:1 entre permeado e retido. Tendo em vista estes resultados, foi evidente que houve uma maior eficiência no processo de ultrafiltração quando utilizada a pressão de 4 bar.

Figura 6- Fluxo de permeado em função do tempo em diferentes pressões



### 5.3.3 Proporção entre permeado e retido

Definida a pressão de trabalho, foi realizado um ensaio para verificar a proporção entre permeado e retido que garantisse a melhor concentração. Como

mostra a Tabela 32, a proporção que garante a melhor concentração de exocelulase é a de 50% de permeado e 50% de retido. O fator de purificação foi maior no permeado, sendo aproximadamente três vezes superior ao fator de purificação no ensaio com 75% de permeado e 25% de retido e 1,5 vezes superior ao ensaio com 25% de permeado e 75% de retido, aproximadamente.

Tabela 32- Concentração de exocelulase para diferentes proporções de permeado e retido

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Proporção	Ext. bruto	6,62	0,038	174,21	
P50% R50%	Permeado	1,58	0,001	1580,00	9,07
	Retido	1,86	0,057	32,63	0,19
P75% R25%	Permeado	2,41	0,005	482,00	2,77
	Retido	2,39	0,072	33,19	0,19
P25% R75%	Permeado	2,17	0,003	723,33	4,15
	Retido	3,15	0,041	76,83	0,44

A proporção entre permeado e retido de 1:1 (P50% e R50%) também foi a ideal para a concentração de endocelulase (Tabela 33). O fator de purificação do permeado nesta condição foi aproximadamente quatro vezes superior às condições P75% R25% e P25% R75%.

Em comparação a outros métodos de concentração de celulasas, como a precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise, os resultados obtidos neste trabalho foram superiores. Foram encontrados fatores de purificação de 2,2 (ZIN; PARK; CHOI, 2014), 1,60 (WANG et al., 2009), 1,42 (TANG et al., 2012) e 1,25 (PRAJAPATI et al., 2018) quando realizada uma única etapa de concentração por precipitação com sulfato de amônio. Sendo assim, o processo de concentração de celulasas por membranas de ultrafiltração é mais eficiente que o de precipitação, utilizado comumente.

Tabela 33- Concentração de endocelulase para diferentes proporções de permeado e retido

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Proporção	Ext. bruto	1,55	0,038	40,79	
P50% R50%	Permeado	1,45	0,001	1450,00	35,55
	Retido	1,95	0,057	34,21	0,84
P75% R25%	Permeado	1,76	0,005	352,00	8,63
	Retido	1,98	0,072	27,50	0,67
P25% R75%	Permeado	1,13	0,003	376,67	9,23
	Retido	1,52	0,041	37,07	0,91

Para a  $\beta$ -1,3-glucanase, o resultado foi semelhante aos anteriores. Como mostra a Tabela 34, a eficiência da ultrafiltração foi três vezes superior em proporções iguais de permeado e retido (P50% R50%), quando comparada a P75% R25% e aproximadamente duas vezes superior a P25% R75% (aproximadamente duas vezes superior).

Em comparação a outros processos de concentração, os resultados obtidos neste trabalho, utilizando membranas de ultrafiltração, foi mais eficiente. Fleuri (2006) obteve um fator de purificação de  $\beta$ -1,3-glucanase de 11,92 utilizando colunas de troca iônica e Bara, Lima e Ulhoa (2003) obtiveram fator de purificação de 9,4 utilizando uma coluna de filtração em gel.



Tabela 34- Concentração de  $\beta$ -1,3-gluconase para diferentes proporções de permeado e retido

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Proporção	Ext. bruto	1,32	0,038	34,74	
P50% R50%	Permeado	1,07	0,001	1070,00	30,80
	Retido	1,46	0,057	25,61	0,74
P75% R25%	Permeado	1,75	0,005	350,00	10,08
	Retido	2,30	0,072	31,94	0,92
P25% R75%	Permeado	1,79	0,003	596,67	17,18
	Retido	2,17	0,041	52,93	1,52

A mesma proporção entre permeado e retido que favoreceu a melhor concentração das demais enzimas expressou também o melhor resultado para quitinase (Tabela 35). O fator de purificação para P50% R50% foi cinco vezes superior à relação P75% R25% e em torno de três vezes superior a P25% e R75%.

A utilização de membranas de ultrafiltração para a concentração de quitinases foi altamente eficiente, quando comparada a outros métodos. Fleuri (2006) obteve um fator de purificação de 6,65 utilizando filtração em gel e Mota (2016) obteve fator de purificação de 2 quando utilizou a precipitação com sulfato de amônio. Rustigel (2014) obteve fatores de purificação que variaram de 1,71 a 2,48, utilizando cromatografia de troca iônica para concentrar quitinases de diversos isolados de *M. anisopliae*. Entretanto, o resultado deste trabalho foi inferior ao encontrado por Sassá et al. (2008), que utilizou o mesmo método e obteve um fator de purificação de 67,5 quando utilizada uma membrana de 10 kDa.

Tabela 35- Concentração de quitinase para diferentes proporções de permeado e retido

Ensaio		Atividade total (U.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
Proporção	Ext. bruto	0,95	0,038	25,00	
P50% R50%	Permeado	0,81	0,001	810,00	32,40
	Retido	1,03	0,057	18,07	0,72
P75% R25%	Permeado	0,80	0,005	160,00	6,40
	Retido	1,48	0,072	20,56	0,82
P25% R75%	Permeado	0,89	0,003	296,67	11,87
	Retido	0,97	0,041	23,66	0,95

Para todas as enzimas avaliadas a relação de filtração (1:1), ou seja, de 50% volume de permeado e 50% de volume no retido garantiram as melhores concentrações das enzimas. Comparando os fatores de purificação nas frações de permeado observou-se que, em geral, os resultados mais baixos foram para a proporção de 75% no permeado e 25% no retido. Isto pode ter ocorrido devido ao entupimento da membrana (*fouling*) com a passagem de uma porção maior de extrato bruto. Como a membrana permite a passagem de determinados solutos, pode ter ocorrido a deposição de solutos maiores que não passam através da mesma, formando uma camada concentrada na sua interface que, por sua vez, impediu a passagem de solutos menores.

Na Figura 7 pode ser observado o declínio no fluxo possivelmente devido à deposição que ocorreu na superfície da membrana. No ensaio P50%, R50% (Figura 7a), a permeabilidade diminuiu 78,8%, reduzindo de 52,11 para 11,02 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>. Já no ensaio P75% R25% (Figura 7b), a redução na permeabilidade da membrana foi a maior (85,7%), caindo de 59,83 para 8,52 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>. As menores reduções na permeabilidade foram encontradas no ensaio P25% R75% (Figura 7c), que diminuiu de 59,48 para 14,14 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, representando uma perda de 76,2% da permeabilidade inicial. Estes resultados eram esperados, uma vez que, quanto maior o volume de caldo enzimático permeado através da membrana, maior será a deposição de material em sua superfície, diminuindo progressivamente a

permeabilidade com o tempo. Isto também pode ser observado na Figura 8, onde a curva da permeabilidade em função do tempo mostra que inicialmente a permeabilidade sofreu uma rápida diminuição, seguida de um decréscimo menos acentuado nas horas seguintes, consequência do material depositado na camada superficial da membrana. A curva do ensaio P25% R75% se sobrepôs à dos demais ensaios.

Figura 7- Permeabilidade da água antes e depois do processo de ultrafiltração utilizando diferentes proporções de permeado e retido (a) P50% R50%; (b) P75% R25%; (c) P25% R75%.

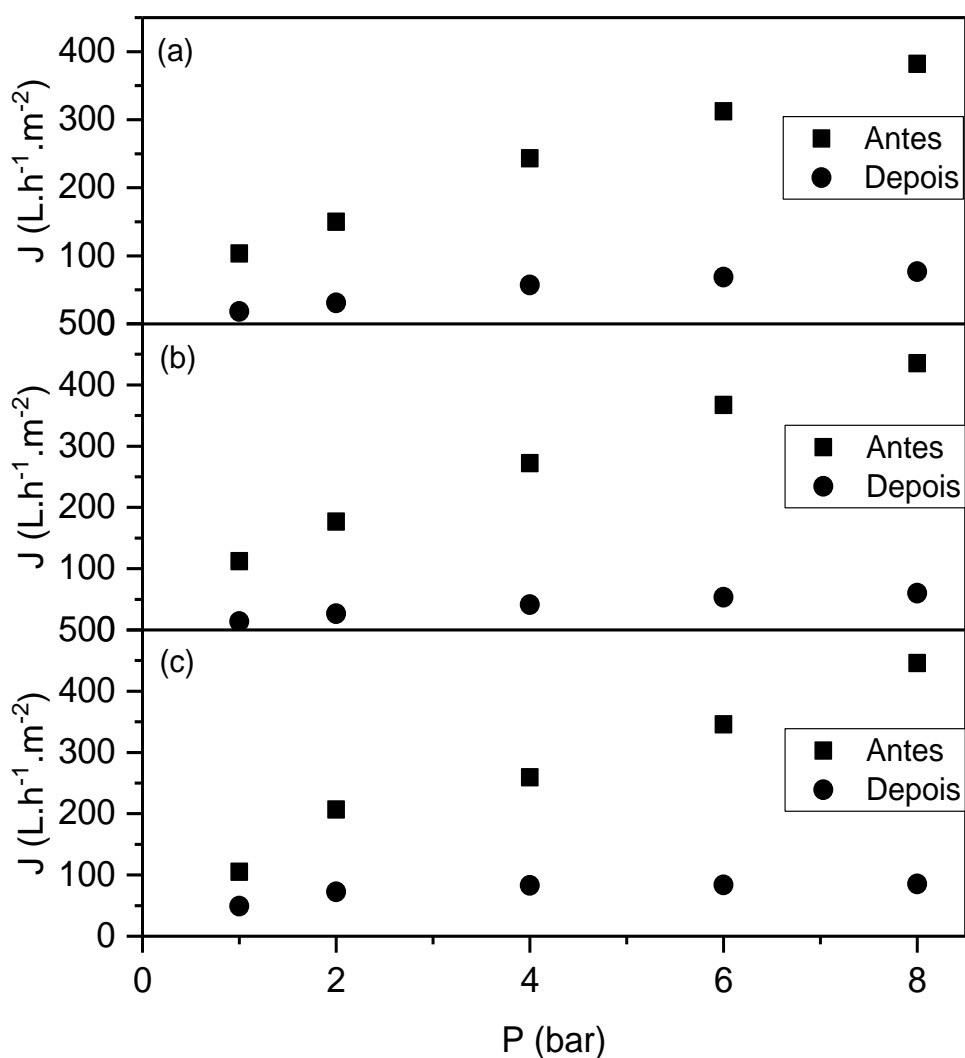
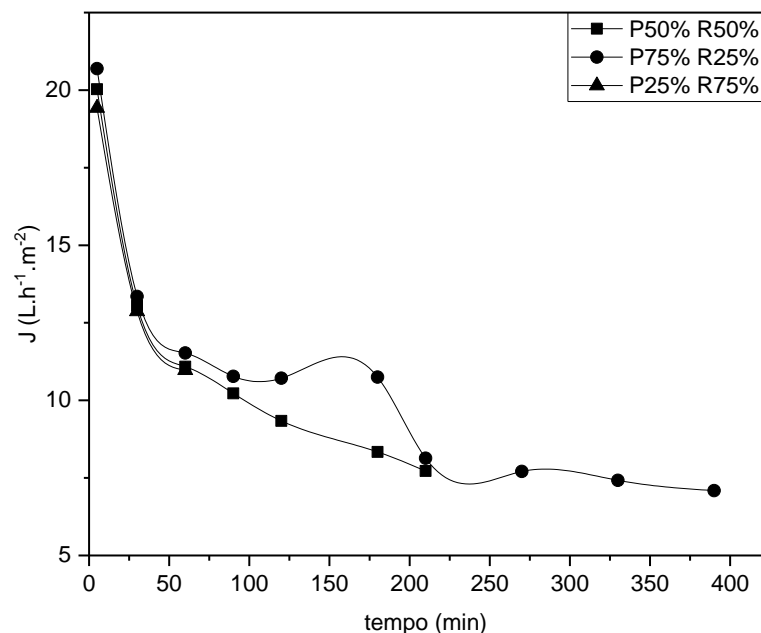


Figura 8- Fluxo de permeado em função do tempo para diferentes proporções de permeado e retido



#### 5.3.4 Reutilização da membrana

A permeabilidade à água em cada um dos quatro usos da membrana foi medida antes e depois da filtração do caldo enzimático e os dados são apresentados na Figura 9. Observa-se que não houve grandes alterações na permeabilidade à água tanto antes quanto depois das filtrações de caldo enzimático, podendo indicar que a limpeza estaria sendo eficiente. Porém, segundo Levitsky et al. (2011), isto não é evidência para a eficiência da limpeza, visto que a limpeza oxidante aumenta a hidrofiliabilidade da membrana. A limpeza hidrofaliza a superfície da membrana por oxidação do grupo terminal do polímero ou dos compostos conservantes usados durante o processo de fabricação. O grau de aumento da permeabilidade tem uma relação linear com a quantidade de proteína adsorvida e o alto fluxo inicial através da membrana limpa é uma consequência da hidrofiliabilidade da superfície da membrana. Se o fluxo for muito maior do que os valores iniciais há maior hidrofiliabilidade e, no caso de membranas de ultrafiltração, este cenário garante o aumento da incrustação de proteínas. A Figura 10 mostra que, ao longo do reuso da membrana, o comportamento do fluxo de permeado de caldo enzimático com o tempo tampouco apresentou variações importantes, apresentando pequenas variações na queda de fluxo no início do processo.

Figura 9 - Permeabilidade à água da membrana antes e após o (a) primeiro, (b) segundo, (c) terceiro e (d) quarto uso.

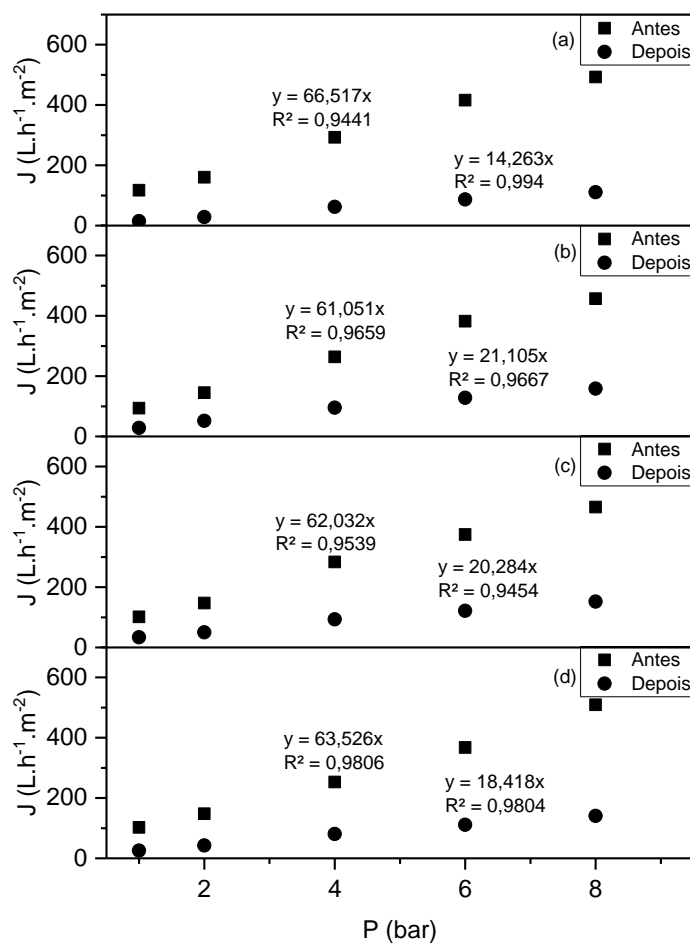
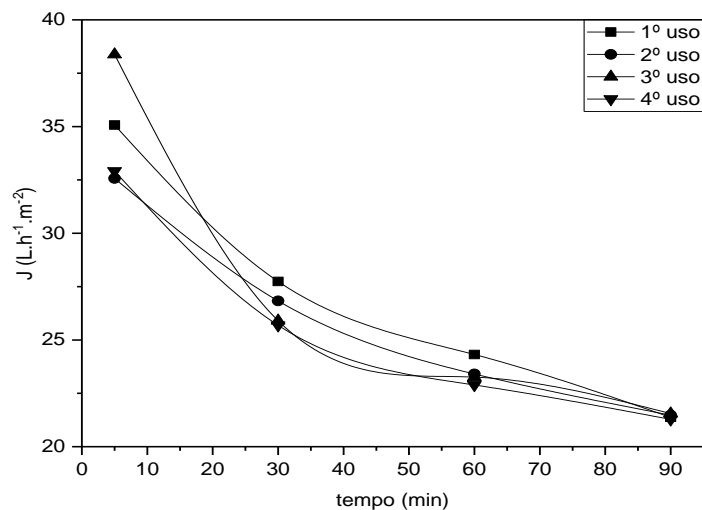


Figura 10- Fluxo de permeado em função do tempo após a reutilização da membrana



Não havendo evidências suficientes sobre a eficiência do processo de limpeza oxidante, o fator de purificação de duas das enzimas estudadas em cada uso foi tomado como parâmetro. Os resultados são apresentados na Tabela 36.

Tabela 36- Atividade específica e fator de purificação de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase após o reuso da membrana

Ensaio		Quitinase		$\beta$ -1,3-glucanase	
		Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação	Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação
	Ext. bruto	67,88		74,36	
1º uso	Permeado	716,90	10,56	555,08	7,46
	Retido	49,30	0,73	58,24	0,78
2º uso	Permeado	686,01	10,11	513,45	6,90
	Retido	40,02	0,59	52,13	0,70
3º uso	Permeado	87,95	1,30	67,56	0,91
	Retido	36,12	0,53	46,54	0,63
4º uso	Permeado	67,00	0,99	79,33	1,07
	Retido	35,38	0,52	43,04	0,58

Observa-se que, tanto a atividade específica quanto o fator de purificação das duas enzimas, nos dois primeiros usos, se mantiveram com poucas alterações, tanto nas frações de permeado como nas de retido. Já a partir do terceiro uso, estes valores diminuíram consideravelmente, comprometendo a eficiência do processo. O fator de purificação de quitinase teve uma redução de 90,6% no permeado, entre o primeiro e o último uso. Já a  $\beta$ -1,3-glucanase, teve uma redução de 85,7% no permeado, onde houve maior concentração de enzimas. Sendo assim, pode-se afirmar que a limpeza oxidante é viável para, no máximo, dois usos da membrana, sem comprometer a eficiência do processo de concentração.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CONCENTRADAS

A Tabela 37 apresenta a matriz do planejamento experimental completo com as respectivas respostas em termos de atividade das enzimas concentradas. Os

resultados demonstraram que a maior atividade de endocelulase ( $1,47 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ocorreu nas condições do ponto central, com temperatura igual a  $35^\circ\text{C}$  e pH 5. A atividade ótima desta enzima é comparável a outras já descritas na literatura, produzidas por outras espécies. Não foram encontrados estudos de caracterização de celulases produzidas por *B. bassiana*. Endocelulases produzidas por *Aspergillus tubingensis* apresentaram o mesmo pH ótimo, porém a temperatura ótima foi de  $70^\circ\text{C}$  (PRAJAPATI et al., 2018). Por outra parte, endocelulases bacterianas (*Salinivibrio* sp.) apresentaram a mesma temperatura ótima ( $35^\circ\text{C}$ ), mas o pH ótimo foi 7,5 (WANG et al., 2009). As celulases produzidas por *Aspergillus fumigatus* apresentaram pH ótimo de 5 e temperatura ótima de  $55^\circ\text{C}$  (BERNARDI et al., 2018).

A maior atividade de exocelulase ocorreu a  $35^\circ\text{C}$  e pH 4 (ensaio 7). Wang et al. (2013) relataram que a atividade ótima de exocelulases de *Neocallimastix patriciarum* ocorreu em temperaturas e pH mais elevados ( $50^\circ\text{C}$  e pH 6), semelhante à encontrada por Chen et al. (2014), onde a atividade ótima da enzima produzida por *Orpinomyces* ocorreu em pH 6 a  $45^\circ\text{C}$ . Isto indica que *B. bassiana* produz uma isoforma de exocelulase diferente a de outras espécies fúngicas. Enzimas celulolíticas incluem diversas enzimas, como endocelulases, exocelulases e  $\beta$ -glicosidases que são classificadas em 78 famílias em 10 clãs. Portanto, os pesos moleculares dessas celulases são diversos. Como o peso molecular das celulases difere, a temperatura e o pH ótimos também são diferentes para cada celulase e geralmente mostram uma ampla faixa de condições ótimas (ZIN; PARK; CHOI, 2014).

As maiores atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase ocorreram nas condições do ensaio 4 ( $45,6^\circ\text{C}$  e pH 5,7). A atividade ótima de  $\beta$ -1,3-glucanases fúngicas se encontram na faixa de pH de 4 a 6 e em temperaturas que variam de  $35$  a  $60^\circ\text{C}$ . A atividade ótima de  $\beta$ -1,3-glucanase produzida por *T. asperillum* ocorreu em  $55^\circ\text{C}$  e pH 5,1 (BARA; LIMA; ULHOA, 2003) e a de *T. harzianum* ocorreu em pH 4,5 e  $60^\circ\text{C}$  (EL-KATATNY et al., 2001). As  $\beta$ -1,3-glucanases de *Chaetomium cupreum* apresentaram atividade ótima em condições semelhantes às deste trabalho, em pH 5 e temperatura de  $45^\circ\text{C}$  (JIANG, 2016). Sendo assim, as condições de atividade ótima encontradas neste trabalho foram comparáveis a outros estudos realizados anteriormente. No estudo da atividade ótima de quitinases é observado que a temperatura ótima pode variar de  $38$  a  $50^\circ\text{C}$  (SASSÁ et al., 2008) enquanto que o pH ótimo varia de 5,5 a 8,5 evidenciando que os fungos são capazes de

produzir variadas isoformas de quitinases (RUSTIGEL, 2014). Diversos isolados de *B. bassiana* apresentaram pH ótimo de 2,5 a 8 e temperaturas ótimas na faixa de 30 a 45°C (SASSÁ et al., 2008). Quitinases de *T. harzianum* apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e 40°C (EL-KATATNY et al., 2001) e as de *T. longibrachiatum*, no mesmo pH mas na temperatura de 55°C (KOVACS et al., 2004).

Tabela 37- Matriz do DCCR para temperatura e pH e atividades enzimáticas

Ensaio	T(°C)	pH	EndoC (U.mL <sup>-1</sup> )	ExoC (U.mL <sup>-1</sup> )	β-1,3-G (U.mL <sup>-1</sup> )	Q (U.mL <sup>-1</sup> )
1	-1 (24,4)	-1 (4,30)	1,20	0,88	1,41	0,82
2	1 (45,6)	-1 (4,30)	1,08	1,01	1,64	0,80
3	-1 (24,4)	1 (5,7)	1,21	1,11	1,76	0,88
4	1 (45,6)	1 (5,7)	1,23	1,10	2,26	0,96
5	-1,41 (20)	0 (5)	1,14	1,21	1,99	0,84
6	1,41 (50)	0 (5)	1,13	1,06	1,70	0,90
7	0 (35)	-1,41 (4)	1,19	1,60	1,18	0,73
8	0 (35)	1,41 (6)	1,13	1,45	1,85	0,89
9	0 (35)	0 (5)	1,45	1,24	1,04	0,86
10	0 (35)	0 (5)	1,47	1,39	1,21	0,87
11	0 (35)	0 (5)	1,45	1,44	1,07	0,82

Com os resultados obtidos no DCCR foram elaborados modelos codificados da atividade enzimática em função da temperatura e pH da reação e validado por análise de variância (ANOVA) para todas as enzimas. Os efeitos das variáveis bem como as análises de variância de todas as enzimas constam no Anexo deste documento. Para a endocelulase, as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) foram a temperatura linear e quadrática e o pH quadrático, como mostra a Equação 5.

$$EndoC = 1,456 - 0,014T - 0,154T^2 - 0,141pH^2 \quad (5)$$

O modelo apresentou coeficiente de determinação de 0,9500, que indica que 95% da variação total da variável dependente (atividade de endocelulase) é



explicada pelo mesmo. O valor de  $F_{\text{calc}}$  foi 20,3 vezes maior que o valor do  $F_{\text{tab}}$  validando o modelo com 95% de confiança. Desta forma, o modelo de regressão ajustado é adequado para estimar a atividade de endocelulase em função da temperatura e pH.

Na atividade de exocelulase, nenhuma variável foi significativa dentro da faixa de temperatura e pH estudada. Por este motivo, não foi possível estimar um modelo que descrevesse a reação enzimática.

Para a  $\beta$ -1,3-glucanase, a temperatura quadrática e o pH linear e quadrático foram as variáveis que tiveram influência na reação enzimática ( $p < 0,05$ ). O modelo que expressa a atividade desta enzima é dado pela Equação 6.

$$\beta\text{-1,3-G} = 1,105 + 0,393T^2 + 0,240pH + 0,227pH^2 \quad (6)$$

O modelo apresentou valor de  $F_{\text{calc}}$  16,5 vezes maior que o valor do  $F_{\text{tab}}$ , sendo validado com 95% de confiança. O coeficiente de determinação de 0,8806 indicou que 88,06% da variação total da variável dependente (atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase) é explicada pelo modelo, sendo adequado para estimar a atividade enzimática.

A única variável significativa na atividade de quitinase foi o pH linear ( $p < 0,05$ ) e o modelo que expressa sua atividade é dado pela Equação 7. O valor de  $F_{\text{calc}}$  6,59 vezes maior que o valor do  $F_{\text{tab}}$  e o coeficiente de determinação de 0,9208 validam este modelo, com 95% de confiança.

$$Q = 0,847 + 0,113pH \quad (7)$$

A partir dos modelos estimados, foram criadas curvas de contorno em função das variáveis estudadas para verificar quais as condições para obtenção de maiores atividades enzimáticas. Observa-se pela Figura 11 que as maiores atividades de endocelulase encontram-se próximas ao ponto central, em pH de 4,6-5,4 e temperaturas que variaram de 30-40°C. Por outro lado, as condições do ponto central desfavorecem a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase (Figura 12), cujas atividades maiores encontram-se em temperaturas e pH mais elevados. Estas temperaturas e pH mais elevados também favorecem a atividade de quitinase (Figura 13), porém

em pH baixos, as atividades foram as menores, independente da faixa de temperatura.

Figura 11- Curva de contorno da atividade de endocelulase

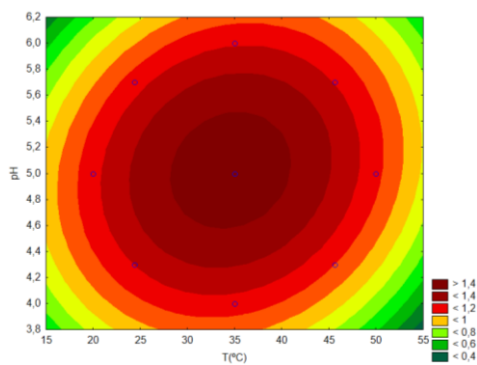


Figura 12- Curva de contorno da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase

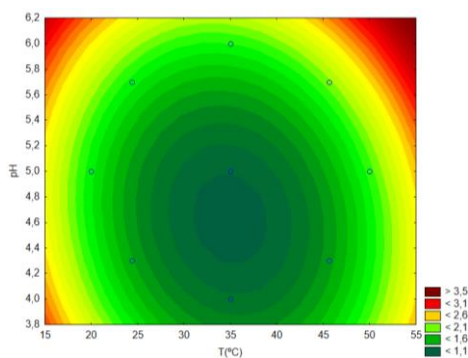
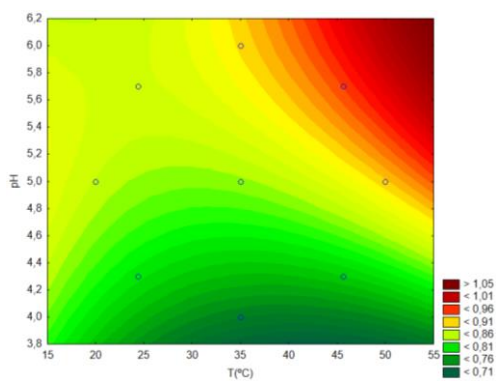


Figura 13- Curva de contorno da atividade de quitinase



## 5.5 ESTABILIDADE DE ENZIMAS

Serão apresentados os resultados da estabilidade das enzimas estudadas frente à temperatura e ao pH. A estabilidade térmica foi estudada em três temperaturas: 20, 30 e 40°C, enquanto que a estabilidade ao pH foi estudada em 4, 5 e 6.

### 5.5.1 Estabilidade térmica

O caldo enzimático concentrado foi incubado em diferentes temperaturas. As quatro enzimas mostraram maior estabilidade a 40°C e menor estabilidade a 20°C.

A exocelulase (Figura 14a) manteve 84% de sua atividade em 168 horas de incubação a 40°C, mas perdeu mais de 50% de sua atividade em temperaturas de 20 e 30°C após 96 e 168 horas, respectivamente. Estudos de exocelulases bacterianas apontam que a enzima teve maior termoestabilidade em temperaturas de 50°C, perdendo sua atividade em temperaturas superiores em 3 horas de incubação (VOLKOV et al., 2014). Em temperaturas de 30 a 50°C, exocelulases de *Orpinomyces* mantiveram mais de 70% de sua atividade quando incubadas por um período de 10 minutos, mas perderam rapidamente sua atividade em temperaturas maiores (CHEN et al., 2014).

A endocelulase (Figura 14b) manteve 63,2% de sua atividade em 168 horas de incubação a 40°C. Porém a 20°C a atividade enzimática teve sua maior redução (57,5%) em apenas 96 horas. Estudos sobre a termoestabilidade de endocelulases produzidas por outros fungos mostram que a enzima produzida por *Salinivibrio* sp. foi termoestável na faixa de 10 a 40°C quando incubada por 24 horas (WANG et al., 2009). Já as endocelulases produzidas por *Aspergillus tubingensis* foram mais estáveis em temperaturas mais elevadas (65 e 70°C) quando incubadas por 180 minutos (PRAJAPATI et al., 2018).

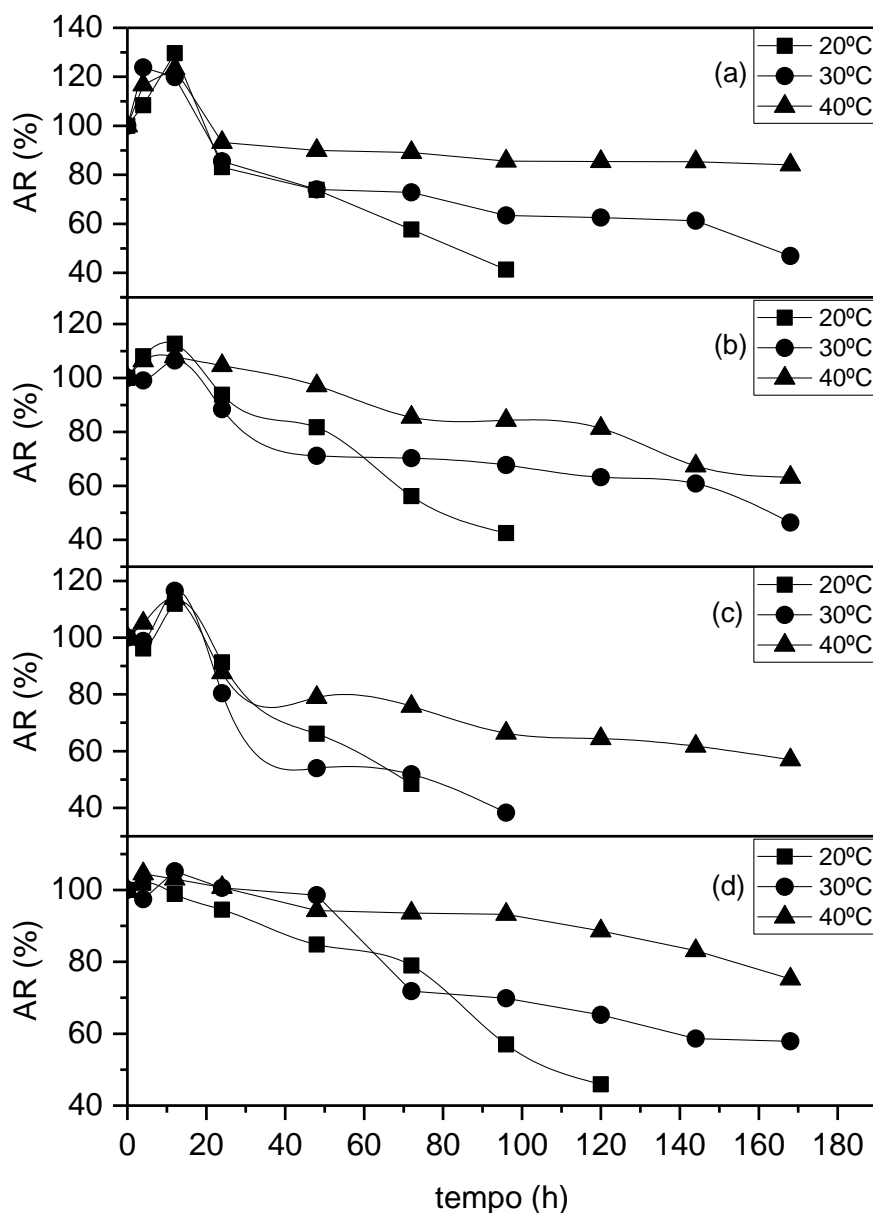
A  $\beta$ -1,3-glucanase (Figura 14c) manteve 56,9% de sua atividade em 168 horas de incubação a 40°C e foram necessárias apenas 72 horas para perder em torno de 50% de sua atividade a 20 e 30°C. De maneira semelhante, as  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas por *T. asperellum* foram termoestáveis em temperaturas próximas (45 a 50°C) quando incubadas por 90 minutos (BARA; LIMA; ULHOA, 2003). A  $\beta$ -1,3-glucanase produzida por *T. harzianum* foi bastante estável até 50°C,

perdendo sua atividade em temperaturas superiores quando incubadas por 30 minutos (EL-KATATNY et al., 2001).

A quitinase (Figura 14d) manteve 69,8% de sua atividade em 168 horas, quando incubada a 40°C. Quando incubada a 30°C, no mesmo período de tempo manteve apenas 37,2% de sua atividade e a 20°C, 45,9% após 96 horas de incubação. A quitinase produzida por *T. harzianum* também foi estável em temperaturas mais elevadas (50°C) quando incubada por 7 horas (EL-KATATNY et al., 2001) da mesma forma que a produzida por *T. longibrachiatum* quando incubadas por 60 minutos (KOVACS, 2004).

No estudo comparativo com outros trabalhos é possível observar resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para as quatro enzimas. Porém, observou-se que os tempos de incubação em todos os trabalhos já publicados foram diferentes e mais curtos. Desconhece-se o comportamento e a estabilidade das enzimas produzidas por outras espécies fúngicas em períodos de tempo maiores e por este motivo a comparação fica limitada. Ainda, é necessário considerar as condições em que foram realizados os ensaios de atividade, visto que tempos de reação, a temperatura, o tampão e o substrato utilizado nestas reações tem relação direta com o resultado final.

Figura 14- Estabilidade térmica de (a) exocelulase, (b) endocelulase, (c)  $\beta$ -1,3-glucanase e (d) quitinase.



As constantes de inativação ( $k$ ) e os tempos de redução decimal ( $D$ ) das enzimas em diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 38. É observado que a constante de inativação térmica diminui com o aumento da temperatura, indicando que as enzimas são mais termoestáveis em temperaturas mais elevadas. O tempo de redução decimal é maior, para todas as enzimas, na temperatura de 40°C, indicando que, nesta temperatura é necessário um tempo muito maior para reduzir a atividade inicial a 90%. Sendo assim, a temperatura que garante a maior estabilidade para as quatro enzimas é a de 40°C.

Tabela 38- Constante de inativação e tempo de redução decimal das enzimas em diferentes temperaturas.

T (°C)	k (h <sup>-1</sup> )	D (h)	R <sup>2</sup>
Exocelulase			
20	0,0098	235,0	0,9585
30	0,0035	657,9	0,8968
40	0,0007	3289,4	0,8935
Endocelulase			
20	0,0115	200,2	0,9730
30	0,0035	657,9	0,8660
40	0,0034	677,2	0,9298
β-1,3-Glucanase			
20	0,0132	174,4	0,9999
30	0,0095	242,4	0,9233
40	0,0029	794,0	0,9736
Quitinase			
20	0,0084	274,1	0,9699
30	0,0053	434,5	0,8572
40	0,0022	1046,6	0,8928

R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação.

### 5.5.2 Estabilidade ao pH

Visando verificar a estabilidade das enzimas frente ao pH, o caldo enzimático concentrado foi incubado em diferentes tampões, com pH que variaram de 4 a 6. As quatro enzimas foram estáveis na faixa de pH estudada, sendo favorecidas por meios mais ácidos.

A exocelulase (Figura 15a) manteve 76,6% de sua atividade em 168 horas de incubação em pH 4 e perdeu aproximadamente 40% de sua atividade em pH 5 e 6, no mesmo período de tempo. A exocelulase produzida por *Penicillium canescens* exibiu atividade máxima em pH 4,0–4,5, mantendo mais de 50% de atividade nas

faixas de pH de 2,5 a 4,0 e 4,5 a 5,5 (VOLKOV et al., 2014). Já a enzima produzida por *Orpinomyces* sp. foi estável na faixa de pH entre 5 e 11 (CHEN, et al., 2014).

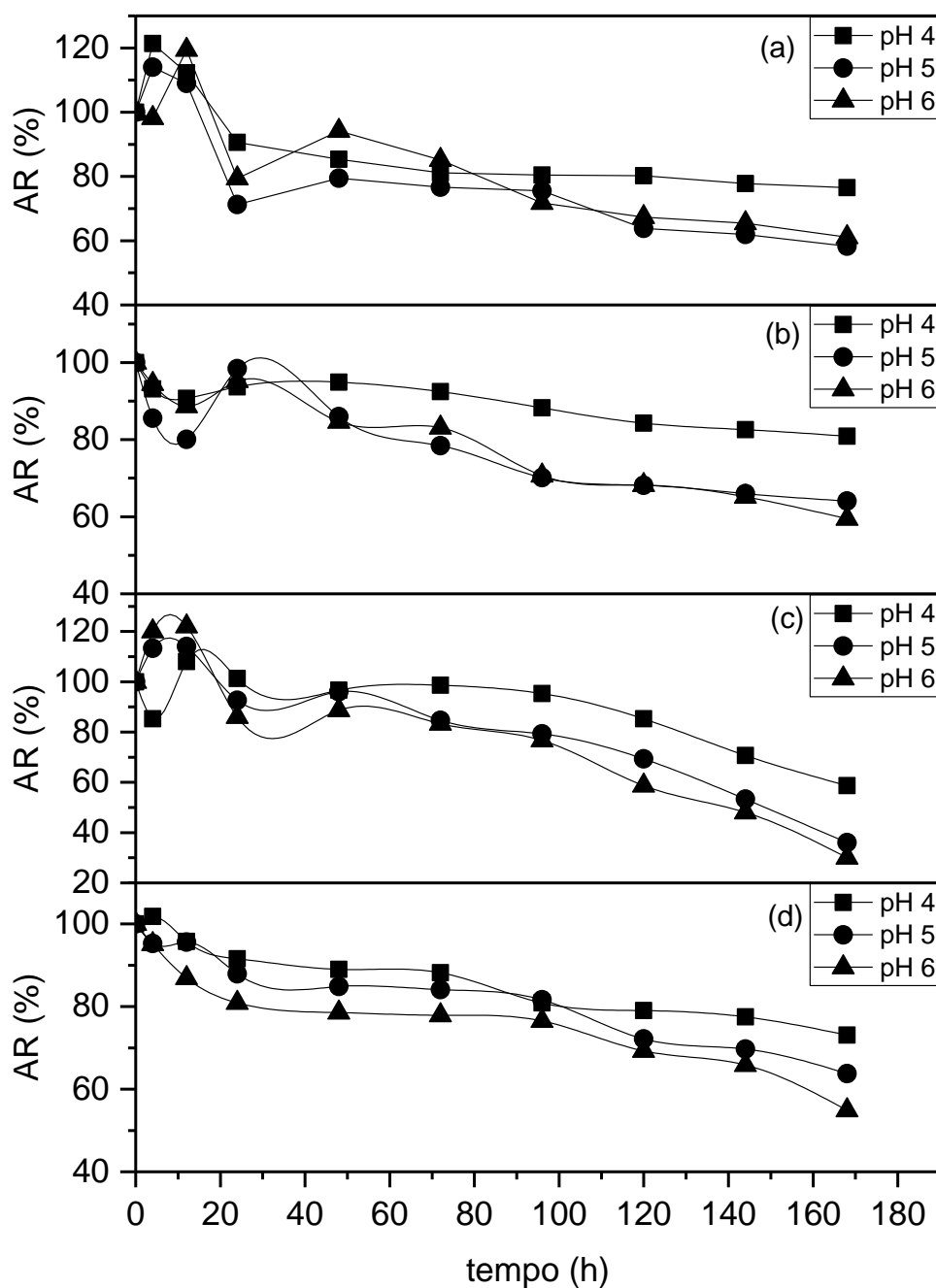
A endocelulase (Figura 15b) manteve 80,9% de sua atividade em 168 horas de incubação em pH 4, porém em pH 5 e 6 manteve 64,1 e 59,4%, respectivamente. A endocelulase produzida por *Salinivibrio* sp. foi estável em uma ampla faixa de pH (de 6,5 a 8,5) quando incubada por 24 horas (WANG et al., 2009). Já a endocelulase produzida por *Aspergillus tubingensis* reteve mais de 60% de sua atividade em pH extremamente ácidos (pH 3) por 24 horas e não teve efeitos adversos em pH 5 (PRAJAPATI et al., 2018). Observou-se que há inúmeras isoformas desta enzima produzidas por diferentes fungos e que tem estabilidade em uma ampla faixa de pH, sendo algumas enzimas de caráter mais ácido e outras, mais alcalino.

A  $\beta$ -1,3-glucanase (Figura 15c) manteve 58,7% de sua atividade em 168 horas de incubação em pH 4 e perdeu aproximadamente 50% de sua atividade em 144 horas quando incubadas em pH 5 e 6. A  $\beta$ -1,3-glucanase produzida por *T. asperellum* foi estável em pH entre 4 e 6, quando incubada por 90 minutos (BARA; LIMA; ULHOA, 2003), de forma semelhante às enzimas produzidas por *T. harzianum* que foram mais estáveis em pH 6 e 7 (EL-KATATNY et al., 2001).

A quitinase (Figura 15d) manteve 73,1% de sua atividade em 168 horas quando incubada em pH 4. No pH 5, no mesmo período de tempo, manteve 63,7% e em pH 6, 54,9%. As quitinases produzidas por *T. harzianum* foram estáveis em uma faixa de pH similar à deste trabalho, que variou entre 4,5 e 7, mas o período de incubação foi de apenas 7 horas (EL-KATATNY et al., 2001).

Observou-se que as quatro enzimas estudadas neste trabalho mostraram ser mais estáveis frente a variações de pH do que as variações de temperatura, tendo esta última maior influência na atividade. Da mesma forma que no estudo comparativo da termoestabilidade, é importante destacar que as comparações realizadas aqui foram limitadas pelas diferenças entre os períodos de incubação e as condições das reações enzimáticas realizadas para determinação da atividade.

Figura 15- Estabilidade ao pH de (a) exocelulase, (b) endocelulase, (c)  $\beta$ -1,3-glucanase e (d) quitinase.



As constantes de inativação ( $k$ ) e os tempos de redução decimal ( $D$ ) das enzimas em diferentes pH apresentados na Tabela 39 mostram que  $k$  aumenta em meios menos ácidos indicando que as enzimas são menos estáveis nestas condições. Para as quatro enzimas, o tempo de redução decimal é maior em pH 4, apontando que, em meios mais ácidos é necessário um período de tempo maior para reduzir a atividade inicial a 90%.



Tabela 39- Constante de inativação e tempo de redução decimal em diferentes pH, a 30°C

pH	k(h <sup>-1</sup> )	D (h)	R <sup>2</sup>
Exocelulase			
4	0,001	2302,6	0,8880
5	0,0028	822,4	0,9300
6	0,0036	639,6	0,9354
Endocelulase			
4	0,0014	1644,7	0,9768
5	0,0029	794,0	0,9164
6	0,0032	719,6	0,9689
β-1,3-Glucanase			
4	0,0056	411,2	0,9417
5	0,0057	404,0	0,9402
6	0,0066	348,9	0,9311
Quitinase			
4	0,0016	1439,1	0,9715
5	0,0024	959,4	0,9433
6	0,0026	885,6	0,9088

R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação

## 5.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Visando avaliar a atividade biológica das frações de permeado e retido, as mesmas foram aplicadas em larvas de *Phereoeca uterella* (traça-das-paredes) e observadas por 168 horas. Nas primeiras 24 horas de ensaio, a aplicação de 20 µL de permeado em cada traça propiciou 100% de mortalidade dos insetos de tamanho pequeno. Em insetos maiores, a mesma proporção ocasionou 40% de mortalidade após 24 horas e 60% de mortalidade em 144 horas. Aplicando-se 10 µL do permeado, obteve-se 20% de mortalidade após 48 horas.

As frações de retido foram as que proporcionaram menores taxas de mortalidade em um período de tempo maior. A aplicação de 20 µL da fração retida

em cada uma das traças ocasionou a morte de 20% dos insetos após 48 horas e 60% após 144 horas. Já a aplicação de 10 µL resultou em 0% de mortalidade nas 168 horas de observação.

A maior concentração de enzimas hidrolíticas, principalmente quitinase, presente no permeado facilitou a degradação da parede celular destes insetos. Em insetos de corpo mole, como são as larvas de lepidópteros, sua exocutícula é fina e indistinguível da epicutícula. Ainda, a membrana artrodial, uma cutícula mais flexível presente nas articulações e entre os segmentos, não tem exocutícula. A exocutícula, por ser esclerotizada e rígida, oferece resistência à força compressiva e uma barreira física mais forte que a endo e a mesocutícula não-esclerotizada. Sendo assim, a ausência de uma exocutícula bem definida, vulnerabiliza estes insetos frente a ataques externos (CHARNLEY; ST LEGER 1991).

Segundo Dhawan e Joshi (2017), a cutícula de insetos em geral é composta de fibrilas de quitina incorporadas em uma matriz de proteínas, lipídios e N-acilcatecolaminas. As enzimas secretadas por *B. bassiana* degradam os principais constituintes da cutícula do inseto e a quitinase é a enzima mais importante para degradar o polímero de quitina de sua cutícula.

A maior atividade de quitinase em quatro isolados de *B. bassiana* mostrou mortalidade máxima contra larvas de *Pieris brassicae*, (Lepidoptera: Pieridae) (DHAWAN; JOSHI 2017). O estudo de Svedese et al. (2013) também forneceu evidências para a relação entre a produção de enzimas e a virulência de *B. bassiana* contra *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Pelizza et al (2012) também relataram uma relação direta entre a patogenicidade de *B. bassiana* e maiores níveis de atividade de quitinase contra *Tropida criscollaris* (Orthoptera: Romaleidae).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* mostrou-se altamente eficiente na produção de enzimas hidrolíticas tanto na fermentação submersa quanto em estado sólido. Em FS, houve uma maior atividade enzimática utilizando sacarose como substrato ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ), suplementada com quitina de caranguejo ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) e extrato de levedura ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Já em FES, as maiores atividades enzimáticas ocorreram utilizando-se arroz tipo I como substrato com 60% de umidade, 1% (m/m) de solução de nutrientes e 2% (m/m) de  $\text{CaCO}_3$ .

A atividade de enzimas foi superior na fermentação em estado sólido, quando comparada à submersa onde a atividade de exocelulase aumentou 52,5%, a de endocelulase 22,0% e a de  $\beta$ -1,3-glucanase 18,1%. Entretanto a atividade de quitinase permaneceu a mesma nos dois processos.

A concentração das enzimas utilizando membranas de ultrafiltração foi mais eficiente utilizando a membrana de MWCO menor (UP010) na pressão de 4 bar e com proporção de permeado e retido de 1:1. A possibilidade de reuso da membrana, utilizando-se uma solução de limpeza oxidante, foi viável apenas para um reuso da membrana. A partir da terceira utilização, sua eficiência diminuiu mais de 80%, apesar da permeabilidade à água permanecer constante. Isto ocorreu devido à hidrofilição da superfície da membrana pela solução de hipoclorito utilizada.

No estudo da temperatura e pH ótimos, maiores atividades de endocelulase encontraram-se em pH de 4,6-5,4 e temperaturas que variaram de 30-40°C. Estas condições desfavoreceram a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, da mesma forma que para a quitinase. Porém em pH baixos, as atividades foram as menores, independente da faixa de temperatura. Quanto à estabilidade térmica, as quatro enzimas mostraram-se altamente estáveis na temperatura de 40°C, sendo mais termoestáveis em temperaturas mais elevadas. Em meios menos ácidos, as enzimas mostraram-se mais instáveis, sendo o pH 4 o mais adequado para manter sua atividade por tempos maiores.

Por último, a aplicação de frações de permeado e retido em larvas de *Phereoeca uterella* (traça-das-paredes), mostrou melhores resultados no permeado, resultados que concordaram com a maior concentração de enzimas hidrolíticas, principalmente quitinase, presente nesta fração facilitando a degradação da parede celular destes insetos.

## REFERÊNCIAS

- ABC BIO. **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico projeta expansão de mercado.** 2015. Disponível em: <<http://www.abcbio.org.br/conteudo/publicacoes/associacao-brasileira-das-empresas-de-controle-biologico-projeta-expansao-de-mercado/>>. Acesso em: 31/08/2017.
- ABC BIO. **Biodefensivos Registrados.** 2016. Disponível em: <<http://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>> Acesso em: 31/08/2017.
- AGUSTINHO, D. P. **Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyma pulvinata* e purificação de uma beta-glucanase do isolado CEN62.** 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** 2ª ed. São Paulo: Fealq, 1998. 1163p.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In: DESHMUKH, S. K.; RAI, M. K. **Biodiversity of fungi: their role in human life.** Enfield: Science Publishers, 2005. cap. 4. p. 49-68, 2005.
- ARRUDA, W. et al. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology.** v.37 n. 3, p. 231–244, 2005.
- AZADI, N.; SHIRZAD, A.; MOHAMMADI, H. A study of some biocontrol mechanisms of *Beauveria bassiana* against *Rhizoctonia* disease on tomato. **Acta Biologica Szegediensis.** v. 60, n. 2, p. 119-127, Dec, 2016.
- BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters.** v. 219, n.1, p. 81–85, 2003.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 86, p. 656-669, May, 2016.
- BERNARDI, A. V. et al. Functional characterization of GH7 endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. **Protein Expression and Purification.** v. 150, p. 1-11, 2018.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças e plantas: Uso e perspectivas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Endophytic *beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin in corn: The influence of the plant growth stage and *ostria nubilalis* (hübner). **Biocontrol Science and Technology.** v. 2, n.1, p.39-47, 1992.

BORGES et al. Eficácia de *Beauveria bassiana* para o controle de *Hedypathes betulinus* em erva-mate, *Ilex paraguariensis*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 41, n. 2, p. 313-320, abr./jun. 2011.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria Normativa Nº 131, de 03 de novembro de 1997. Estabelece procedimentos para registro e avaliação ambiental de agentes biológicos empregados no controle de uma população ou de atividades biológicas de organismos nocivos, visando a defesa fitossanitária. **Diário Oficial da União**. Brasília, 04 nov. 1997, Seção 1, p. 24988-24991. Disponível em: <[https://www.mprs.mp.br/media/areas/gapp/arquivos/atualizacao\\_intra/dou/port\\_131\\_97.pdf](https://www.mprs.mp.br/media/areas/gapp/arquivos/atualizacao_intra/dou/port_131_97.pdf)> Acesso em: 08/06/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta SDA/SDC Nº 2, de 12 de Julho de 2013. Estabelece as especificações de referência de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. **Diário Oficial da União**. Brasília, 15 jul. 2013, Seção 1, p. 6-8. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/inc-02-2013-especificacao-de-referencia>> Acesso em: 08/06/2017.

CAFARCHIA, C. et al. Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Parasites and Vector**. v. 8, n. 80. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0693-9>> Acesso em: 06/09/2017.

CITO, A. et al. Cuticle-degrading and toxins as virulence markers of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Basic Microbiology**. v. 56, p. 941-948, 2016.

CHARNLEY, A. K.; ST LEGER, R. J. The Role of Cuticle-Degrading Enzymes in Fungal Pathogenesis in Insects. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Springer. 1991. cap. 12. p. 267-286, 1991.

CHAVAN, S. B. et al. Stability studies of cuticle degrading and mycolytic enzymes of *Myrothecium verrucaria* for control of insect pests and fungal phytopathogens. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 16, p. 404-412, Jul, 2017.

CHEN, Y. C. et al. A highly active beta-glucanase from a new strain of rumen fungus *Orpinomyces* sp.Y102 exhibits cellobiohydrolase and cellotriohydrolase activities. **Bioresource Technology**. v. 170, p. 513–521, 2014.

CULEBRO-RICALDI, J. M. Antifunga properties of *Beauveria bassiana* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 3 in tomato crop. **Journal of Environmental Biology**. v. 38, p. 821-827, Sep, 2017.

DA SILVA, F. L. et al. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. **Renewable Energy**. v. 16, p. 299-308, Feb, 2018.

DALLA SANTA, H. S., et al. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. **Brazilian archives of biology and technology**. v.48 p.51-60. June, 2005.

DALLA SANTA, H. S. et al. Controle biológico em pragas de *Ilex paraguariensis* (A. St.- Hil.) Com fungo *Beauveria* sp. **Floresta**. Curitiba, PR, v. 39, n. 1, p. 67-76, jan./mar. 2009.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma  $\beta$ -Glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 125p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DE FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 22 p. 18-21, set./out. 2001.

DE MARCO, E. G. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp.** 2012. 97p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2012.

DHAWAN, M; JOSHI N. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 522-529, 2017.

DIAS, B. A. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

DO CANTO, W.L.; MENEZES, T. J. B. **Estudos Econômicos – Alimentos Processados. Produção, usos e mercado de enzimas**. Campinas: Ital. 1995.

DOS SANTOS, T. C., et al. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus* sp. Através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea* L.). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v.3, n.3, 2011.

ECODEBATE. **Brasil usa 19% dos Agrotóxicos Produzidos no Mundo; Governo Registra 8 Mil Casos de Intoxicação por Agrotóxicos em 2011**. 2012. Disponível em: < <https://www.ecodebate.com.br/2012/05/10/brasil-usa-19-dos-agrotoxicos-produzidos-no-mundo-governo-registra-8-mil-casos-de-intoxicacao-por-agrotoxicos-em-2011/>>. Acesso em: 20/06/2018.

EL-KATATNY, M. H. et al. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 56, p. 137–143, 2001.

EMBRAPA. **Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>> Acesso em: 08/06/2017.

FARINAS, C. S. **A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação.** São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. **Biocontrol Science and Technology.** v.4, p. 3-34, 1994.

FLEURI, L. F.  **$\beta$ -1,3 Glucanases, Proteases e Quitinases: Produção, Purificação e Aplicação.** 2006. 213p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade.** v.7, n.2, p. 111-125, jul./dez. 2004.

FRANCESCHINI, M. et al. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** v. 23, p. 32-37, 2001.

GARCIA, M, O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: ortheziidae).** 2004. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GARICA-ESTRADA, C.; CAT, E.; SANTAMARTA, I. *Beauveria bassiana* as Biocontrol Agent: Formulation and Commercialization for Pest Management. **Agriculturally Important Microorganisms.** Singapore: Springer. p. 81-96, Nov, 2016.

GHOSE T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry.** v. 59, n. 1, p. 257-268, 1987.

GIESE, E. C. et al. Comparison of  $\beta$ -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal.** v. 53, p. 239-243, 2011.

HAMÚ, Y. F. **Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyma pulvinata*, caracterização bioquímica de uma proteinase e purificação parcial desta enzima.** 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)- Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 64, p. 175-186, 2004.

HONG, T. Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase of *Paenibacillus* sp. Isolated from garden soil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 61, p. 472-478, 2003.

JUNGES, A. ***Metarhizium anisopliae*: expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases.** 2010. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

JIANG, C. et al. Expression and Characterization of a Novel Antifungal Exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Chaetomium cupreum*. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 182, n. 1, p. 261-275, Nov, 2016.

KANG, S. W. et al. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letters.** v. 27, p. 135–139, 2005.

KARTHIK, N. et al. Production, purification and properties of fungal chitinases- A review. **Indian Journal of Experimental Biology.** v. 52, p. 1025-1035, Nov, 2014.

KIM, J. S.; JE, Y. H. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87, n. 5, p. 1639-48, Aug, 2010.

KIM, K; YANG, Y; KIM, J. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology.** v. 36, n. 2, p. 185-189, March, 2003.

KUMAR, C. M. S., et al. Characterization and virulence of *Beauveria bassiana* associated with auger beetle (*Sinoxylon anale*) infesting allspice (*Pimenta dioica*). **Journal of Invertebrate Pathology** v. 139, p. 67-73, 2016.

KUMAR, D. P. et al. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian Journal of Microbiology.** v. 52, n. 3, p. 388-395, July/Sept, 2012.

KOVACS, K. et al. Production of Chitinolytic Enzymes With *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in Solid Substrate Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v. 118, p. 189-204, 2004.

LEVITSKY, I. et al. Understanding the oxidative cleaning of UF membranes. **Journal of Membrane Science.** v.377, p. 206-213, 2011.

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v. 20, n. 20, p. 1-6, 2013.



LIBARDI, N., et al. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**. v. 57, p. 190-199, 2017.

LODISH, H et al., **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre : Artmed, 2014. 1244p.

LOZANO-TOVAR, M. D. et al., Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. **Biological Control**. v. 67, n. 3, p. 409-420, dec. 2013.

LOZANO-TOVAR, et al. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. **Crop Protection**. v. 100, p. 186-195, oct, 2017.

MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavor production by solid state fermentation of orange peel waste. **Biochemical Engineering Journal**. v. 101, p.1-8, sept, 2015.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**. Jan. 2018.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World J Microbiol Biotechnol**. v.32. n. 11. p.177-203. sep, 2016.

MICHEREFF-FILHO, M. et al. **MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: Como estamos?** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 28 p.

MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Controle Biológico de doenças de plantas. **Periódicos existentes no Brasil e onde encontrá-los - Guia Básico**. Recife. Imprensa Universitária-UFRPE. 1993.

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

MOINO JR, A. et al. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopilae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.267-273, abr/jun, 2002.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**. v.3, n.5, p. 9-23, jan-jun, 2009.

MOTA, H. R. O. **Quitinase Classe I do Látex de *Ficus Benjaminia* L. Purificação Caracterização e Ação Contra Fungos Fitopatogênicos de Interesse Agrônomo**. 2016. 59p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

NEVES, Pedro M.O.J.; HIROSE, Edson. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotrop. Entomol.** Londrina, v.34, n.1, p.77-82, Feb, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2005000100011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2005000100011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 07/06/2017.

OBEROI, H. S. et al. Production of Cellulases through Solid State Fermentation Using Kinnow Pulp as a Major Substrate. **Food Bioprocess Technol.** v. 3, p. 528-536, 2010.

OLIVEIRA, I. et al. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. **Annals of Microbiology.** v.61, n. 2, p.339-344, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; FARIA, M; R.; CASTRO, M. L. M. P. **Regulamentação de produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004. 33p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2021185/doc119.pdf/eb98ea8f-eb48-4355-83c5-a10da384d44b>>. Acesso em: 31/08/2017.

OWNLEY, B. H. et al. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 98, n. 3, p. 267-270, July, 2008.

OWNLEY, B.; GWINN, K. D.; VEGA, F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl,** v. 55, p. 113-28, 2010.

PARRA, J. R. P., et al. **Controle biológico no Brasil. Parasitoides e Predadores.** São Paulo: Manole, 2002. 635 p.

PELIZZA, S. A. et al. Screening of Argentine native fungal strains for biocontrol of the grasshopper *Tropidacris collaris*: relationship between fungal pathogenicity and chitinolytic enzyme activity. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 28, n. 4, p.1359-1366,2012

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde.** v. 14, n. 2, p. 714-734, ago./dez. 2016.

PHAM, T.A.; KIM, J. J.; KIM, K. Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. **Mycobiology.** v.38, n. 2, p.137-43, 2010.

PIRES, A. P. D. **Caracterização morfológica, atividade enzimática, diversidade genética e patogenicidade de espécies de *Beauveria* sobre *Diatraea Saccharalis*.** 2007. 83p.Tese (Doutorado em Biologia de fungos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

PITSON S. M.; SEVIOUR R. J.; MCDUGALL B. M. Effect of carbon source on extracellular (1–3)- and (1–6)- $\beta$ -glucanase production by *Acremonium persicinum*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 5 p. 432–439, 1997.

PRAJAPATI, B. P. et al. Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. **Bioresource Technology**. v. 250, p. 733-740, 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. New York: CRC Press, 2014. 336p.

RUSTIGEL, C. B. **Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopilae***. 2014, 276p. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2014

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270, 2004.

SANDHU, S. S. et al. Efficacy of Entomopathogenic Fungi as Green Pesticides: Current and Future Prospects. *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability*. Singapore: Springer. v. 6, p. 327-349, Dec, 2017.

SASSÁ, D. C. et al. Evaluation of kinetic parameters of chitinases produced by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, n. 4, 2008.

SENTHILRAJA, G. et al. Chitin-based bioformulation of *Beauveria bassiana* and *Pseudomonas fluorescens* for improved control of leafminer and collar rot in groundnut. **Crop Protection**. v. 29, n. 9, p. 1003-1010, Sept, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. Cellulases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2017. cap.4 p 73-101, 2017.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v.2, 2001. 541p.

SOUZA, A. R. C. et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. Isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p. 575-578, Sep, 2015.

SVEDESE, V. M. et al. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 46, p.6491-6497, Nov, 2013.

TANG, B. et al. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02. **Biomass and Bioenergy**. v. 36, p. 366-372, 2012.

THANGADURAI, D.; SANGEETHA, J. **Industrial biotechnology: sustainable production and bioresource utilization**. New Jersey: Apple Academic Press, 2016. 484p.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. 3. ed. Boston: Springer. 2007. 579p.

VOLKOV, P. V. et al. Homologous cloning, purification and characterization of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium canescens*. **Protein Expression and Purification**. v. 103, p. 1-7, 2004.

WANG, C. Y. et al. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, p. 373-379, 2009.

WANG, H. C. et al. Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. **Protein Expression and Purification**. v. 90, n. 2, p. 153–159, 2013.

WANG, Q. et al. Excellent waste biomass-degrading performance of *Trichoderma asperellum* T-1 during submerged fermentation. **Science of the Total Environment**. v. 609, p. 1329-1339, 2017.

ZHIHUI, B. et al. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. **Journal of Environmental Sciences**. v. 20, p. 353-358, 2008.

ZIN, H. W.; PARK, K. H.; CHOI, T. J. Purification and characterization of a carboxymethyl cellulase from *Artemia salina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 443 p. 194–199, 2014.

## ANEXOS

Tabela 40- Efeito das variáveis T e pH na atividade de endocelulase

Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	1,456	0,026	55,46	<0,0001
T(L)	-0,028	0,032	-0,86	0,4315
T(Q)*	-0,307	0,038	-8,00	0,0005
pH(L)	0,023	0,032	0,70	0,5153
pH(Q)*	-0,281	0,038	-7,32	0,0007
Interação T e pH	0,072	0,045	1,59	0,1723

\*: Variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 41- Análise de variância para a atividade de endocelulase

Fonte de variação	Soma quadrados	Graus liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	0,243	2	0,243	117,58
Resíduos	0,010	5	0,002	
Total	0,253	7		

F<sub>tab (5;2;0,05)</sub> = 5,79.

Tabela 42- Efeito das variáveis T e pH na atividade de exocelulase

Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	1,357	0,129	10,49	0,0001
T(L)	-0,025	0,159	-0,16	0,8793
T(Q)	-0,380	0,189	-2,01	0,1008
pH(L)	0,029	0,159	0,18	0,8635
pH(Q)	0,017	0,189	0,09	0,9335
Interação T e pH	-0,068	0,224	-0,30	0,7730

Tabela 43- Efeito das variáveis T e pH na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase

Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	1,105	0,114	9,726	0,0002
T(L)	0,079	0,139	0,564	0,5972
T(Q)*	0,785	0,166	4,720	0,0052
pH(L)*	0,479	0,139	3,437	0,0185
pH(Q)*	0,455	0,166	2,733	0,0411
Interação T e pH	0,134	0,197	0,682	0,5258

\*: Variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 44- Análise de variância para a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase

Fonte de variação	Soma quadrados	Graus liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	1,61	3	1,61	89,47
Resíduos	0,19	5	0,02	
Total	1,80	8		

F<sub>tab (5;3;0,05)</sub> = 5,41.

Tabela 45- Efeito das variáveis T e pH na atividade de quitinase

Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	0,847	0,014	60,48	0,0000
T(L)	0,034	0,017	2,01	0,1011
T(Q)	0,037	0,020	1,79	0,1333
pH(L)*	0,113	0,017	6,60	0,0012
pH(Q)	-0,025	0,020	-1,24	0,2711
Interação T e pH	0,049	0,024	2,00	0,1015

\*: Variável estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 46- Análise de variância para a atividade de quitinase

Fonte de variação	Soma quadrados	Graus liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	0,026	1	0,026	43,55
Resíduos	0,003	5	0,001	
Total	0,029	6		

$$F_{\text{tab}(5;1;0,05)} = 6,61.$$