

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**Cristiane Bianchi Loureiro dos Reis**

**PRODUÇÃO DE QUITINASES E BIOSSURFACTANTES FÚNGICOS  
POR PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Santa Maria, RS  
2017

**Cristiane Bianchi Loureiro dos Reis**

**PRODUÇÃO DE QUITINASES E BIOSURFACTANTES FÚNGICOS POR  
PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência do Solo**.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo J. S. Jacques

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reis, Cristiane Bianchi Loureiro dos  
Produção de quitinases e biossurfactantes fúngicos por processos fermentativos / Cristiane Bianchi Loureiro dos Reis.- 2017.  
77 f.; 30 cm

Orientador: Rodrigo J. S. Jacques  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2017

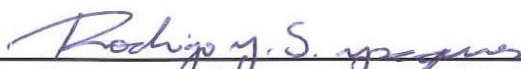
1. Biodiversidade 2. Bioprodutos 3. Microrganismos 4. Sustentabilidade 5. Agricultura I. Jacques, Rodrigo J. S. II. Título.

**Cristiane Bianchi Loureiro dos Reis**

**PRODUÇÃO DE QUITINASES E BIOSURFACTANTES FÚNGICOS POR  
PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência do Solo**.

**Aprovado em 29 de maio de 2017:**



---

**Rodrigo J. S. Jacques, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Fátima Bento, Dra. (UFRGS)**

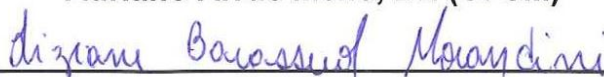


---

**Márcio A. Mazutti, Dr. (UFSM)**

---

**Adriano Arrué Mello, Dr. (UFSM)**



---

**Liziane Barassuol Morandini, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2017

## RESUMO

### PRODUÇÃO DE QUITINASES E BIOSSURFACTANTES FÚNGICOS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS

AUTORA: Cristiane B. Loureiro dos Reis

ORIENTADOR: Rodrigo J. S. Jacques

O crescimento agrícola do Brasil está alicerçado na utilização de grandes quantidades de agrotóxicos sintéticos, os quais resultam em elevados custos de produção e degradação ambiental. Por outro lado, o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta e a utilização não predatória deste recurso pode contribuir para a obtenção de bioprodutos para uso em sistemas agrícolas mais sustentáveis. Assim, o objetivo da tese é obter quitinases e biossurfactantes a partir do cultivo otimizado em biorreatores de microrganismos, visando o desenvolvimento de bioinseticidas e bioadjuvantes para uso agrícola. A produção da quitinase pelo fungo *Metharizium anisopliae* foi otimizada em meio de fermentação sólido contendo bagaço de cana como substrato. Através de um delineamento composto central rotacional foi avaliada a influência das variáveis quantidade de quitina, temperatura e umidade, resultando em uma atividade quitinolítica máxima de  $6.78 \text{ U g}^{-1}$ . Os fungos produtores de biossurfactantes foram isolados a partir do solo do Bioma Pampa. Após a seleção, o isolado mais promissor foi identificado por técnicas de biologia molecular como sendo da espécie *Fusarium fujikuroi*. Para otimizar a produção de um biossurfactante foi realizada uma matriz Plackett-Burman e um delineamento composto central rotacional. As variáveis avaliadas foram pH, temperatura, agitação, quantidade de inóculo e período de incubação no meio de fermentação submersa, contendo glicose como fonte de carbono. O fungo é um eficiente produtor de biossurfactante pois reduziu a tensão superficial do meio de crescimento de 72 para  $20 \text{ mN m}^{-1}$  na melhor condição. Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  indicaram a presença de alfa-beta-trealose na estrutura do biossurfactante. Desse modo, o presente estudo é o primeiro relato da biossíntese de um biossurfactante contendo alfa-beta-trealose por *F. fujikuroi*, sugerindo que o produzido pertence à classe dos trealolipídeos.

**Palavras-chave:** Biodiversidade. Bioprodutos. Microrganismos. Sustentabilidade. Agricultura.

## ABSTRACT

### OBTANTION OF CHITINASES AND BIOSURFACTANTS FROM MICROORGANISMS

AUTHORA: CRISTIANE BIANCHI LOUREIRO DOS REIS  
ADVISOR: PROF. DR. RODRIGO J. S. JACQUES

Brazil's agricultural growth is based on the use of large quantities of synthetic agrochemicals, which result in high production costs and environmental degradation. On the other hand, Brazil harbors the greatest biodiversity on the planet and the non-predatory use of this resource can contribute to obtaining bioproducts for use in more sustainable agricultural systems. Thus, the aim of the thesis is to obtain chitinases and biosurfactants from the optimized culture in bioreactors of microorganisms, aiming the development of bioinsecticides and bioadjuvants for agricultural use. Chitinase production by the fungus *Metharizium anisopliae* was optimized in solid fermentation medium containing sugarcane bagasse as a substrate. The influence of the variables chitin mass, temperature and humidity was evaluated through a rotational central composite design, resulting in a maximum chitinolytic activity of  $6.78 \text{ U g}^{-1}$ , indicating that it is possible to increase the scale of chitinase production in bioreactors. The fungi producing biosurfactants were isolated from the soil of the Pampa Biome. After selection, the most promising isolate was identified by molecular biology techniques as being of the species *Fusarium fujikuroi*. To optimize the production of a biosurfactant, a Plackett-Burman matrix was used to evaluate the pH, temperature, agitation, inoculum quantity and incubation period in the submerged fermentation medium containing glucose as the carbon source. The biosurfactant activity was detected by the surface tension of the growth medium, which was reduced from  $72 \text{ mN m}^{-1}$  to  $28.04 \text{ mN m}^{-1}$  in the best condition. The results obtained so far demonstrate the potential of *F. fujikuroi* for the optimization of the scaling up of biosurfactant production in bioreactors. Physical-chemical analysis of the biosurfactant will also be performed and the ability to reduce surface tension in formulations with insecticides will be evaluated

**Keywords:** Bioproducts. Microorganisms. Bioreactors. Fermentation.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
1.1.1	A Biodiversidade e seu Potencial Biotecnológico.....	9
1.1.2	Bioinseticidas no controle de pragas .....	9
1.1.3	Enzimas quitinases e seu potencial bioinseticida.....	12
1.1.4	Mecanismo bioinseticida das quitinases fúngicas .....	15
1.1.5	Produção das quitinases por processos fermentativos .....	17
1.1.6	Biossurfactantes.....	19
1.1.7	Produção de biossurfactantes por processos fermentativos .....	22
1.1.8	Aplicações dos biossurfactantes .....	25
1.2	HIPÓTESES .....	28
1.3	OBJETIVO GERAL.....	28
1.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1 – PRODUCTION OF CHITINASE FROM <i>Metarhizium anisopliae</i> BY SOLID STATE FERMENTATION USING SUGARCANE BAGASSE AS SUBSTRATE</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 2 – FIRST REPORT OF THE PRODUCTION OF A POTENT BIOSURFACTANT WITH A, B-TREHALOSE BY <i>FUSARIUM FUJIKUROI</i> UNDER OPTIMIZED CONDITIONS OF SUBMERGED FERMENTATION....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
	<b>ANEXO A – MATERIAL SUPLEMENTAR REFERENTE AO ARTIGO 2.....</b>	<b>74</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

A expansão agrícola do Brasil está alicerçada na utilização de elevadas quantidades de insumos sintéticos para a adubação e o controle de pragas e doenças, resultando em elevados custos de produção, na dependência de poucas empresas multinacionais produtoras destes insumos e em danos ao ambiente. Atualmente um dos maiores desafios da agricultura brasileira é desenvolver sistemas agrícolas sustentáveis, que possam produzir alimentos e fibras em quantidade e qualidade suficientes, com reduzido impacto sobre os recursos ambientais e com eficiência técnica.

Neste sentido, diversos países têm sido levados a adotarem legislações mais rigorosas para o registro e utilização de agrotóxicos, visando reduzir os impactos negativos na saúde do homem e no ambiente. Nos Estados Unidos, a imposição de leis de regulamentação está gradualmente reduzindo o número de produtos sintéticos disponíveis para uso agrícola (DAYAN et al., 2009). O Parlamento Europeu aprovou em 2009 um regulamento que proíbe a utilização de substâncias altamente tóxicas e determina que as nocivas sejam substituídas por alternativas mais seguras. Além disso, estabeleceu um programa para reduzir a dependência dos agrotóxicos (QUÍMICA..., 2010). Seguindo a tendência mundial, o Brasil tem restringido ou proibido o uso de produtos como a cihexatina, metamidofós e endossulfan (FORMENTI, 2010; ANVISA, 2012). A Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA/MAPA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) publicaram no início de 2015 a Instrução Normativa Conjunta (INC) nº1, que proíbe, até o encerramento do processo de reavaliação ambiental, a aplicação de agrotóxicos e afins à base de Fipronil, Imidaclopride, Tiametoxam ou de Clotianidina na cultura do algodão e em culturas de inverno instaladas a menos de 300 metros das áreas de cultivo do algodoeiro em fase de florescimento (MAPA, 2015).

Uma alternativa aos produtos agrícolas sintéticos são os bioprodutos gerados pelos microrganismos. Nos últimos anos, diferentes tipos de produtos microbianos têm gerado interesse devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade (JOSHI et al., 2015). Assim, a prospecção de microrganismos capazes de produzir bioprodutos e sua posterior utilização em processos fermentativos de escala industrial tem sido alvo de diversos estudos. Um exemplo disto é o uso dos fungos entomopatogênicos,



os quais são reconhecidos como uma alternativa viável para a substituição dos produtos químicos, pois o biocontrole realizado por estes organismos pode ser ambientalmente seguro e eficaz na mitigação de insetos (BAI et al., 2012). Outros microrganismos também têm se destacado na produção de biossurfactantes (JOSHI et al., 2015; MOUAFI et al., 2016), os quais podem ser empregados nas formulações de biocidas de origem microbiana e em muitas outras aplicações, como na indústria farmacêutica, de alimentos, ambiental, etc. Entre os microrganismos de maior importância como fonte de bioprodutos destacam-se as actinobactérias e os fungos, que são excelentes produtores de metabólitos secundários. Conforme reportado por Qin (2011), dos 22.000 bioprodutos obtidos de microrganismos até 2002, 45% foram produzidos por actinobactérias, especialmente por representantes do gênero *Streptomyces*. Com relação ao potencial biológico de fungos, o espectro também é amplo e embora a maioria dos estudos vise a descoberta de fármacos para emprego na área da saúde, muitas substâncias produzidas por microrganismos já apresentaram atividades biológicas de interesse para agricultura.

Considerando que a maior parte da diversidade de microrganismos do solo ainda é desconhecida, e conseqüentemente as substâncias produzidas por eles, há concreta expectativa que estes possam representar uma fonte promissora de bioprodutos. Deste modo, a busca por microrganismos em um habitat ainda pouco explorado pode contribuir não só para o conhecimento da diversidade microbiana neste habitat, como também permitir a descoberta de novos produtos de interesse biotecnológico.

Dentro deste contexto, é urgente a busca de alternativas que reduzam o uso de agrotóxicos sintéticos nas lavouras do Brasil, que é um dos líderes mundiais no consumo destes insumos. Uma alternativa para isto é a utilização de bioprodutos com ação inseticida ou surfactante produzidos por microrganismos por meio de processos fermentativos. Em conjunto, há a possibilidade de se identificar novos produtos microbianos para diversos fins e aplicações na área agrícola, como compostos antifúngicos, citotóxicos, bactericidas, nematicidas, etc.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 A Biodiversidade e seu Potencial Biotecnológico

O crescente desenvolvimento agrícola tem resultado em elevada utilização de produtos sintetizados a partir de fontes não renováveis, contribuindo para aumentar a demanda por produtos derivados do petróleo e a poluição ambiental. Desse modo, a busca por uma agricultura sustentável, com a utilização mais racional dos recursos naturais, tem se tornado essencial para o desenvolvimento econômico, social e ambiental do país.

Neste contexto, existe a necessidade crescente por produtos novos, com química melhorada, altamente ativos ao alvo e atóxicos para o não alvo. Estes fatores são pré-requisitos no desenvolvimento de novas biomoléculas/bioproductos e para isto a indústria tem buscado na microbiologia, nanobiotecnologia, na biofísica e na modelagem molecular as ferramentas para o desenvolvimento dos novos agentes de controle (SINGH et al., 2013).

O Brasil detém 22% da biodiversidade do planeta (BOLDRINI et al., 2010), a qual é ainda pouco explorada, especialmente quanto à avaliação/seleção de microrganismos para processos biotecnológicos. Desta forma, a prospecção de microrganismos do ambiente pode contribuir para o desenvolvimento econômico e sustentável do país, devido aos inúmeros processos biotecnológicos que são desenvolvidos a partir dos microrganismos.

### 1.1.2 Bioinseticidas no controle de pragas

A agricultura tem sido cada vez mais afetada pela atividade destrutiva de inúmeros organismos, incluindo fungos, plantas daninhas e artrópodos (principalmente insetos), podendo ocasionar a diminuição no rendimento das culturas. As pragas são continuamente introduzidas em novas áreas, natural ou acidentalmente, além disso, o intenso comércio mundial de produtos agrícolas tem resultado no aumento do número de espécies de pragas não nativas agressivas em novas áreas. Assim, o controle dessas espécies agressivas representa um sério desafio em todo o mundo.

Há muitas décadas os agrotóxicos sintéticos têm sido utilizados no controle de pragas e doenças. No entanto, o seu uso indiscriminado resultou na proibição de diversos princípios ativos devido às preocupações com a saúde humana e com o ambiente, ao ressurgimento de pragas, a resistência de pragas a certos inseticidas e aos efeitos letais sobre organismos não alvo (ABUDULAI et al., 2001). Atualmente, alguns agrotóxicos químicos estão sofrendo grande pressão para serem retirados do mercado devido ao seu impacto negativo ao ambiente (GHRIBI et al., 2012).

Portanto, a busca por alternativas mais sustentáveis é necessária para a geração de produtos agrícolas de alta qualidade. Por isso, há a necessidade do desenvolvimento de biopesticidas para o controle eficaz de pragas agrícolas, sem causar danos graves à cadeia ecológica ou o agravamento da poluição do ambiente. Os biopesticidas são definidos como agentes produzidos em massa a partir de um microrganismo vivo ou um produto natural que são utilizados no controle de pragas das plantas (MNIF; GHRIBI 2015). De acordo com a substância ativa, os biopesticidas podem ser classificados como: (i) microbianos, (ii) compostos bioquímicos e (iii) semioquímicos (CHANDLER et al., 2011).

Bactérias, fungos, oomicetos, vírus e protozoários estão sendo utilizados para o controle biológico de insetos-praga, patógenos de plantas e ervas-daninhas. Dentre os biopesticidas microbianos destaca-se a proteína cristalina produzida por *Bacillus thuringiensis* (Bt) que é capaz de provocar a lise das células do intestino dos insetos. Outros exemplos de inseticidas microbianos incluem produtos à base de baculovírus e fungos entomopatogênicos. Nos EUA e na Europa, o vírus da granulose *Cydia pomonella* (CpGV) é utilizado como um bioinseticida contra a traça da maçã. No Brasil, desde a década de 80, o nucleopoliedrovírus da lagarta *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV) tem sido utilizado no combate deste inseto. Recentemente Brito et al. (2015) mapeou o genoma completo de 17 isolados de AgMNPV e relatou que o pangenoma desses vírus contém 167 genes hipotéticos, dos quais 151 são compartilhados nos 17 genomas mapeados. Além disso, o fungo ascomiceto *Metarhizium anisopliae* é utilizado no Brasil para a formulação de biopesticidas comerciais no controle de cigarrinhas em cerca de 750.000 ha de cana e 250.000 ha de pastagens naturais (LI et al., 2010). Pelo menos 170 diferentes biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos já foram desenvolvidos para utilização contra pelo menos cinco ordens acarinas em culturas de estufa, frutas e legumes de campo, assim como em lavouras de grande porte, com cerca da metade dos

produtos provenientes da América Central e do Sul (FARIA;WRAIGHT, 2007). A maioria dos produtos baseia-se em metabólitos, tais como enzimas, produzidas principalmente pelos ascomicetos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Os biopesticidas bioquímicos são obtidos através de metabólitos secundários de plantas. Elas apresentam baixa toxicidade em mamíferos e se degradam rapidamente após a aplicação, por isso levaram ao desenvolvimento de piretrinas sintéticas (piretros) (SILVERIO et al., 2009). Outro biopesticida bioquímico muito utilizado no controle de insetos é o óleo de neem, um produto químico extraído de sementes de *Azadirachta indica* (CARVALHO et al., 2012).

Os semioquímicos são sinais químicos produzidos por um organismo que causam mudanças comportamentais em indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes. A maioria dos semioquímicos utilizados para a proteção das culturas são feromônios sexuais de insetos, alguns dos quais são sintetizados e utilizados no monitoramento ou controle de pragas através da captura em massa (REDDY et al., 2009), da atração e morte dos insetos (EL-SAYED et al., 2009) e da confusão sexual (WITZGALL et al., 2008).

Os biopesticidas apresentam baixa geração de resíduos, baixa toxicidade, boa compatibilidade com o ambiente e podem ter alta eficiência (MNIF; GHRIBI 2015). Além disso, a resistência de biopesticidas por organismos alvo não é facilmente gerada, ao contrário do que ocorre com alguns de seus homólogos químicos. Assim, os biopesticidas têm se tornado uma tendência na indústria global de produtos agrícolas.

Desse modo, diversos microrganismos têm sido estudados com o objetivo de desenvolver biopesticidas. Os biopesticidas microbianos desenvolvidos a partir de bactérias, fungos, oomicetos, vírus e protozoários estão sendo utilizados no controle biológico de pragas, patógenos de plantas e ervas-daninhas. Em 2006, quando Thakore realizou um levantamento os biopesticidas fúngicos , a utilização de bactérias para a produção de biopesticidas ocupava a maior parcela do mercado (74%), seguida por biopesticidas fúngicos (10%), biopesticidas virais (5%), biopesticidas de predadores (8%) e outros biopesticidas (3%).

O biopesticida microbiano mais utilizado é composto pela bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt), a qual produz uma proteína cristalina (d-endotoxina) durante a esporulação bacteriana, capaz de provocar a lise das células digestivas quando consumida por insetos suscetíveis (JISHA et al., 2013).

Além de produzir cristais de proteínas inseticidas, diversas cepas de *B. thuringiensis* são capazes de produzir enzimas quitinases (GOMAA, 2012; ROSAS-GARCIA et al., 2013). Como a membrana peritrófica do intestino dos insetos é composta por uma matriz de quitina, a presença da quitinase nas formulações de *B. thuringiensis* pode melhorar a absorção das proteínas cristalinas, potencializando a atividade inseticida. Alguns estudos anteriores já demonstraram uma maior eficiência no controle de larvas de pragas quando quitinases foram adicionadas a formulações contendo proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis* (DRISS et al., 2011). A enzima extracelular quitinase produzida por *B. subtilis* reduziu efetivamente a atividade das enzimas intestinais e o crescimento de *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae), podendo ser utilizada na formulação de um biopesticida eficaz para o controle dessa praga, a qual está distribuída em todo o mundo e causa danos nas culturas do algodão, amendoim, tomate, tabaco, batata, soja e em brássicas (CHANDRASEKARAN et al., 2012; 2014). Atualmente, para contornar o problema da baixa atividade endógena de quitinases por *B. thuringiensis*, a engenharia de proteínas tem sido utilizada na obtenção de quitinases mutantes com uma alta atividade catalítica. No estudo de Ni et al. (2015), a enzima mutante ChiW50A obtida a partir da transformação de um gene (*CHI9602*) que codifica a produção de quitinases por *B. thuringiensis* apresentou atividade contra fungos patógenos de plantas e larvas de *Helicoverpa armigera* e *Caenorhabditis elegans*.

### 1.1.3 Enzimas quitinases e seu potencial bioinseticida

As enzimas quitinases são capazes de degradar a quitina presente nas paredes celulares de fungos e no exoesqueleto de insetos. Por isso, são agentes potenciais para o controle biológico de doenças e pragas. A quitina é um polímero de N-acetilglucosamina ligado por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. É um constituinte importante das paredes das células de fungos, do exoesqueleto de insetos e da carapaça de crustáceos. É um polissacarídeo cristalino encontrado sob três formas na natureza:  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - quitina. A  $\alpha$ -quitina é a mais abundante e mais compacta forma, devido ao arranjo antiparalelo das cadeias e as fortes ligações com o hidrogênio. A  $\beta$ -quitina é a forma menos estável devido ao arranjo paralelo das cadeias de quitina. A terceira forma polimérica é a  $\gamma$ -quitina, a qual é uma mistura da

$\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. A  $\beta$ -quitina é mais solúvel e mais facilmente hidrolisada do que a  $\alpha$ -quitina (KURITA, 2006).

Esse polímero linear pode ser hidrolisado pela ação de ácidos, bases ou enzimas, como as lisozimas, algumas glucanases e quitinases (LARIBI-HABCHI et al., 2015). Apesar de sua abundância e estabilidade, a quitina não é acumulada no ambiente, devido à presença de enzimas quitinolíticas. A hidrólise das cadeias glicosídicas de quitina é catalisada pela ação das quitinases, as quais degradam a quitina em dissacarídeos e oligossacarídeos de cadeia longa. Vários organismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e animais produzem quitinases, as quais apresentam diversas funções, incluindo defesa, digestão de nutrientes, morfogênese e patogênese (RATHORE; GUPTA, 2015).

As quitinases (EC 3.2.2.14) são hidrolases glicosídicas, caracterizadas por hidrolisar as ligações  $\beta$ -1,4 de N-acetilglucosamina presentes nas cadeias de quitina, as quais variam de 20 kDa a cerca de 90 kDa (BHATTACHARYA et al., 2007). Na natureza, a quitina é encontrada ligada com pigmentos, proteínas e minerais, como o carbonato de cálcio, fazendo com que no processo de degradação da quitina, ela necessite ser desproteinizada e desmineralizada utilizando ácidos ou bases fortes. No entanto, estes processos apresentam custos elevados, baixo rendimento e problemas de corrosão (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014). Portanto, a utilização de quitinases para a hidrólise de resíduos quitinolíticos é uma alternativa para mitigar os problemas relacionados ao ambiente, principalmente por serem biodegradáveis.

As quitinases são divididas em duas categorias principais: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases clivam randomicamente os sítios internos dos polímeros de quitina, gerando multímeros de glicosamina de baixo peso molecular, tais como quitotriose, quitobiose e diacetilquitobiose. As exoquitinases são classificadas em duas categorias: as quitobiosidases (EC 3.2.2.29), que catalisam a liberação de diacetilquitobiose dos terminais não-redutores, e as N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.30), que clivam os produtos oligoméricos obtidos pela ação das endoquitinases em monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (JUNG; PARK, 2014).

Com base na semelhança dos aminoácidos dos organismos produtores de quitinases, elas foram divididas nas famílias 18, 19 e 20 de glicosil hidrolases (HENRISSAT; BAIROCH, 1993). A família 18 compreende quitinases de vírus,

fungos, bactérias, animais e certos vegetais. A família 19 compreende quitinases de algumas plantas e de *Streptomyces* (HART et al., 1995). As famílias 18 e 19 não apresentam semelhanças nas sequências de aminoácidos e possuem estruturas diferentes. A família 20 envolve N-acetilglicosaminidases produzidas a partir de bactérias, fungos e humanos.

Na natureza, vários organismos produzem diferentes tipos de enzimas quitinolíticas. Algumas bactérias como *Serratia* e *Bacillus* são reconhecidas por produzir quatro diferentes tipos de quitinases. Várias quitinases foram isoladas a partir de bactérias tais como *B. cereus* (LIANG et al., 2014), *B. licheniformis* (NGUYEM et al., 2012) e *Stenotrophomonas maltophilia* (SUMA; PODILE 2013). Uma quitinase extracelular produzida por *Bacillus subtilis* apresentou alta atividade inseticida sobre *Spodoptera litura* Fab. na concentração de 6  $\mu$ M em 48 h (CHANDRASEKARAN et al. 2012).

Entretanto, os fungos filamentosos produzem mais de vinte tipos de quitinases (HARTL et al., 2012). Todas as quitinases de fungos relatadas até o momento pertencem à família 18 de glicosilhidrolases (KARLSSON; STENLID, 2009). Esta família possui um domínio catalítico em forma de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> e seu mecanismo enzimático é de retenção, o qual resulta em quito-oligossacarídeos em configuração  $\beta$ -anomérica (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010).

A família 18 de quitinases fúngicas é composta por cinco domínios: catalítico, região N-terminal do peptídeo, região de ligação à quitina, regiões ricas em serina/treonina e a região C-terminal (HARTL et al., 2012). O domínio catalítico é o mais importante desta enzima, pois é responsável pela hidrólise da quitina. Uma comparação entre os aminoácidos de quitinases revelaram duas regiões altamente conservadas na família 18, D<sub>xx</sub>D<sub>x</sub>D<sub>x</sub>E e S<sub>x</sub>GG, correspondendo ao sítio catalítico e aos sítios de ligação ao substrato (HENRISAT; BAIROCH, 1996).

As quitinases fúngicas da família 18 são agrupadas em três grupos filogenéticos, A, B e C (SEIDL et al., 2005), os quais são divididos em três subgrupos: A-II a A-V, B-I a B-V e C-I a C-II (KARLSSON; STENLID, 2008). O subgrupo A-V contém membros com atividade exoquitinase, enquanto os subgrupos B-I, B-II e B-IV contêm membros com atividade endoquitinase. Uma recente caracterização do subgrupo A-II demonstrou a atividade de exo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (van MUNSTER et al., 2012), enquanto o subgrupo B-V possui membros com atividade endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (STALTS et al.,

2010). Em geral, as quitinases pertencentes ao grupo C são direcionadas para a via secretora, devido a presença de um domínio N-terminal. A modelagem estrutural das quitinases do grupo C indica a atividade de exoenzimas (GRUBER et al., 2011).

#### **1.1.4 Mecanismo bioinseticida das quitinases fúngicas**

O uso indiscriminado de inseticidas sintéticos tem ocasionado a resistência dos insetos e a degradação dos ecossistemas, sugerindo a necessidade de novas alternativas de controle. Os biopesticidas são uma alternativa ao uso de agrotóxicos sintéticos, pois possuem baixa toxicidade para os seres humanos e causam menos riscos ao ambiente.

Nos insetos, a quitina é um componente significativo da cutícula, constitui parte do exoesqueleto e recobre parcialmente linhas ao longo dos órgãos internos, incluindo o trato digestivo. Além disso, é um componente da membrana peritrófica que cobre o intestino médio (PETERS, 1992). As enzimas quitinases são utilizadas por insetos para degradar a quitina durante o processo de muda, sendo muito importantes no controle biológico de insetos e fungos fitopatogênicos. Desse modo, é possível empregar as quitinases na formulação de biopesticidas.

Alguns fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, são capazes de produzir múltiplas enzimas degradativas, incluindo as enzimas extracelulares quitinases, as quais favorecem a penetração dos agentes patogênicos na barreira imposta pela cutícula dos insetos e aceleram o processo infeccioso (EL-SAYED et al. 1989). Como estas enzimas degradam a quitina, sugere-se que ao serem aplicadas sobre o inseto ou injetadas no intestino de larvas de insetos, elas possam causar danos significativos para o exoesqueleto e para estrutura da membrana peritrófica, resultando na morte das larvas (BINOD et al., 2007). Em um estudo conduzido por Patil e Jadav (2015), a quitinase produzida pelo fungo *P. ochrochloron* afetou o crescimento de larvas de *Helicoverpa armigera*, aumentando a mortalidade de larvas e pupas, e diminuindo a emergência de adultos quando aplicada topicamente.

O fungo *Metarhizium anisopliae* isolado a partir de uma espécie de carrapato demonstrou níveis variados de patogenicidade para várias ordens de insetos. Sugerindo que o fungo *M. anisopliae* pode ser utilizado para a formulação de um micoinseticida capaz de infectar uma ampla gama de pragas de animais domésticos,



como carrapatos, ácaros e moscas (POLAR et al., 2008). Segundo Kershaw et al. (1999), há dois mecanismos de virulência ativos quando isolados de *M. anisopliae* invadem e matam insetos: uma estratégia tóxica e uma estratégia de crescimento. Na estratégia tóxica os insetos são mortos por peptídeos cíclicos tóxicos, como as destruxinas produzidas por alguns isolados de *M. anisopliae*. A morte é seguida pelo crescimento de hifas ao longo das cavidades do corpo dos insetos. Na estratégia de crescimento, os insetos são mortos quando as hifas fúngicas proliferam através da hemocele usando os nutrientes. Em geral, o processo de infecção inicia-se após o contato do fungo *M. anisopliae* com um hospedeiro em potencial. O fungo penetra através do tegumento do inseto com a combinação de pressão mecânica e de enzimas que degradam a cutícula. Depois de entrar na hemocele do inseto, as hifas se propagam rapidamente. A dificuldade de nutrição, a destruição de tecidos e órgãos, ou a liberação de toxinas fúngicas provoca a morte do inseto. Após a morte, as hifas colonizam e emergem na superfície do mesmo (JAVAR et al., 2015).

Leemon e Jonsson (2008) propuseram um terceiro mecanismo de virulência, o qual ocorre pela ação de enzimas extracelulares produzidas por *M. anisopliae* que desagregam o exoesqueleto dos insetos. Em um estudo conduzido por estes autores (LEEMON; JONSSON 2012), os resultados confirmaram a ocorrência deste terceiro mecanismo, utilizado por isolados de *M. anisopliae* no processo infeccioso de carrapatos bovinos (*Rhipicephalus microplus*) e moscas varejeiras de ovinos australianos (*Lucilia cuprina*). O isolado (ARIM16) apresentou alta virulência matando 95% dos carrapatos após 2 dias e 88 ( $\pm 2$ )% de moscas após 4 dias. Nesse estudo um mecanismo de patogenicidade envolvendo a destruição da cutícula foi observado, principalmente porque o número de conídios de *M. anisopliae* por unidade de área foi importante para a morte rápida do carrapato. Este resultado confirma a estratégia de virulência proposta por Leemon e Jonsson (2008), na qual ocorre o rompimento do exoesqueleto dos carrapatos quando infectados por *M. anisopliae*.

A penetração do fungo na cutícula de um inseto é o passo inicial e mais crítico do processo de infecção. A cutícula dos insetos é composta principalmente por fibrilas de quitina imersas numa matriz de proteínas, as enzimas proteases e quitinases responsáveis pela degradação da cutícula são fundamentais na patogenicidade fúngica. Dentre os genes envolvidos na degradação da cutícula do inseto pelo fungo *M. anisopliae*, um gene que codifica uma protease de serina

(PR1), um gene que codifica uma quitinase de 44 kDa (CHI2) e um gene que codifica uma enzima com atividade exo e endo-quitinase (CHI3) têm sido caracterizados, clonados e transformados para aumentar a virulência (STAATS et al., 2013).

### 1.1.5 Produção das quitinases por processos fermentativos

Os processos fermentativos<sup>1</sup> para a produção de quitinases por microrganismos têm sido bastante estudados nos últimos anos, principalmente com o objetivo de obter um alto rendimento de quitinases com menor custo. Atualmente, a disponibilidade comercial das quitinases em larga escala é restrita devido aos altos custos de produção, e também pela baixa atividade e estabilidade da enzima (SURESH 2012).

As quitinases fúngicas são produzidas predominantemente por fermentação submersa (FSbm). Porém, a fermentação em estado sólido (FES) também tem sido utilizada para a produção de quitinases. A FSbm apresenta vantagens no controle do processo e pela facilidade de recuperação das enzimas extracelulares produzidas, porém os produtos são mais diluídos se comparados aos obtidos por FES. A utilização de substratos baratos e a relativa facilidade na condução do processo são vantagens da FES, porém alguns problemas são relatados nesse tipo de fermentação, tais como a dificuldade de esterilização do substrato, o controle do pH e da temperatura, a manutenção da pureza da cultura e a duração do processo (KARTHIK et al., 2014). A fermentação submersa apresenta menor transferência de oxigênio em meio líquido, enquanto a transferência de calor é o principal problema relacionado com a fermentação em estado sólido (KARTHIK et al., 2014).

Geralmente a produção de quitinases a partir de microrganismos é induzida metabolicamente. Isso é observado porque a presença de quitina nos meios de produção aumenta o rendimento das quitinases. A quitina coloidal é o melhor agente indutor da produção de quitinases em comparação com outras fontes. A presença de quitina coloidal no meio de fermentação aumentou em 33% a produção de enzimas quitinolíticas por *Streptomyces griseus* (AVRAMENKO; GALYNKIN 2010).

---

<sup>1</sup> Fermentação é um tipo de metabolismo microbiano anaeróbio, onde a geração da energia ocorre sem a cadeia de transporte de elétrons. Neste texto, assim como já consolidado na microbiologia industrial e na engenharia de bioprocessos, fermentação será utilizada como sinônimo de cultivo aeróbio.

A adição de outras fontes de carbono ao meio de cultura contendo quitina proporciona um efeito misto no rendimento das quitinases. A repressão/indução da produção de quitinases por meio da presença de glicose é um fenômeno comum na expressão dos genes responsáveis pela produção de quitinases por fungos cultivados em FSbm e FES (REYES et al., 2012). Um importante aspecto a ser observado na produção das quitinases por processos fermentativos é que o objetivo final é a produção em larga escala, o que impõem a necessidade da utilização de meios de cultivo industriais. A característica principal destes meios é o seu baixo custo, por isto são utilizados reagentes de grande disponibilidade na região e custo reduzido, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, farelos de trigo, água de maceração de milho, etc. Além disso, no preparo desses meios, o ambiente natural é utilizado como modelo de composição, pois os requerimentos nutricionais dos microrganismos refletem o tipo de ambiente onde eles são encontrados. Porém, a utilização destes resíduos agroindustriais impõe mais uma dificuldade à produção das quitinases, pois a otimização das condições de cultivo se torna mais difícil se comparada a utilização de reagentes sintéticos (PRESCOTT et al. 2002). Para que seja atingido um bom rendimento na fermentação industrial utilizando resíduos agroindustriais é necessário ter um meio de cultivo equilibrado em nutrientes, a composição do meio deve ser invariável, os resíduos não devem interferir na recuperação do produto para evitar o aumento dos custos com purificação e não deve ocorrer repressão metabólica (STAMBURY et al. 1995).

O período de incubação apresenta um efeito significativo na produção de quitinases, os níveis de produção aumentam durante certo período de tempo e após diminuem. O principal motivo para a diminuição da produção se deve ao consumo gradual dos nutrientes no meio de cultura. Esse comportamento da enzima pode ser observado no estudo realizado por Hao et al. (2012), onde após uma fase de adaptação de aproximadamente 48h dos microrganismos, o rendimento das quitinases aumentou gradualmente e atingiu o rendimento máximo após cerca de 84h, decaindo drasticamente após esse período.

A fonte de nitrogênio utilizada apresenta um papel fundamental na produção de quitinases. No estudo conduzido por Jabeen e Qazi (2014) diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio foram utilizadas, tais como triptona, gelatina, peptona, extrato de levedura, uréia, cloridrato de amônio, oxalato de amônio e

fosfato de amônio dihidrogenado. Dentre essas fontes, a peptona proporcionou um maior rendimento de quitinases produzidas por *Bacillus cereus*.

O pH e a temperatura de incubação apresentam um papel importante na produção de quitinases. Isso é confirmado pelo fato de que a produção de quitinases ocorre preferencialmente em pH abaixo de 6.0 (WASLI et al., 2009; MA et al., 2012). Porém, são verificadas algumas exceções como por exemplo, a espécie fúngica *Basidioborus ranarum* que produz quitinases em pH 9.0 (MISHRA et al. 2012). Com relação à temperatura, tanto na FSbm como na FES a produção máxima de quitinases ocorre em temperaturas mesofílicas de 25-35°C (SUDHAKAR; NAGAJARAN 2011; CHEN et al., 2013)

Apesar do aumento da utilização da FES para a produção das quitinases, ainda existem muitos desafios para a obtenção de uma alta e estável produção dessas enzimas. Por isso, a combinação das variáveis a serem utilizadas para a otimização do meio de produção é uma ferramenta muito importante. A otimização de bioprocessos utilizando métodos estatísticos têm sido muito utilizada para a obtenção de altos rendimentos das quitinases. Por exemplo, Sudhakar e Nagajaran (2010) otimizaram um meio de cultura para obter alta produção de quitinases por *Trichoderma harzianum* utilizando a combinação do delineamento Plackett-Burman com o delineamento composto central rotacional (DCCR).

### 1.1.6 Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica e uma região lipofílica. Devido a esta estrutura, tendem a acumular-se nas interfaces entre as fases de fluídos com polaridades diferentes (por exemplo, óleo-água ou óleo-ar) reduzindo a tensão superficial e interfacial (GUDIÑA et al., 2013). Eles são caracterizados por sua estrutura química, pelo balanço hidrofílico-lipofílico e pela concentração micelar crítica (CMC). A CMC é a menor concentração em que ocorre a formação de micelas em um surfactante. Abaixo da CMC a tensão superficial varia significativamente com a concentração do surfactante e acima da CMC os compostos orgânicos hidrofóbicos (COH) apresentam alta solubilidade (TRELLU et al., 2016).

Os surfactantes sintéticos apresentam alta eficiência na extração de COH (MAO et al., 2015), porém a maioria são sintetizados quimicamente a partir de fontes

petroquímicas e são apenas parcialmente biodegradáveis, causando efeitos prejudiciais ao ambiente (REBELO et al., 2014). Além disso, os surfactantes podem formar emulsões com alta viscosidade e de difícil remoção. Os surfactantes são agrupados em quatro categorias de acordo com suas propriedades iônicas em água: aniônicos (dodecilsulfato de sódio (SDS) ou sulfonato de alquibenzeno linear - LAS), catiônicos (amônia quaternária), anfóteros (cocoamidopropil hidroxisultaína- CAS) e não-iônicos (Tween 80 e Triton X 100) (MULLIGAN et al., 2001).

A grande importância dos surfactantes tem resultado na exploração dos recursos naturais em busca de novas estruturas com propriedades surfactantes superiores, porém menos prejudiciais ao ambiente. Assim, locais contaminados com petróleo têm sido apontados como fontes ricas de microrganismos produtores de biossurfactantes. Desse modo, os biossurfactantes têm atraído muitos estudos essencialmente por sua baixa toxicidade, por serem biodegradáveis e mais compatíveis com “tecnologias verdes” (SINGH et al., 2013; SAMADHAN et al., 2014).

Os biossurfactantes são compostos similares aos surfactantes sendo capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre substâncias polares e apolares (água/óleo, óleo/água) e com alta atividade emulsificante, produzidos como metabólitos secundários de seres vivos, que podem ser isolados de amostras de solos contaminados e não contaminados por hidrocarbonetos (MARCHANT; BANAT, 2012, MNIF et al., 2013).

A porção hidrofóbica dos biossurfactantes é usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (PACWA-PLOCIENNICZAK et al. 2011). A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Conforme sua estrutura química, os biossurfactantes são caracterizados como glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, lipídeos neutros ou lipopolissacarídeos (GUDIÑA et al., 2013, GEYS et al., 2014).

Os microrganismos podem produzir biossurfactantes de baixo ou elevado peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos ou lipopeptídeos, enquanto os de alto peso molecular são lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou combinações destes (DESAI; BANAT, 1997). Os biossurfactantes

mais comumente estudados são glicolípideos, contendo os açúcares ramnose ou trealose, produzidos por uma série de microrganismos como os pertencentes aos gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e outros (LANGER et al. 2006).

As bactérias, juntamente com as arqueas, são as principais responsáveis pela produção destes compostos tensoativos. A *Pseudomonas aeruginosa* tem sido reconhecida por sua capacidade de produzir biossurfactantes da classe dos ramnolípideos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004), enquanto *Bacillus subtilis* é amplamente conhecido pela produção de surfactina (PORNUNTHORNTAWEE et al. 2008). Os biossurfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, através de processos de fermentação. Os açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de biossurfactantes ecologicamente seguros.

As principais vantagens dos biossurfactantes são a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, aceitabilidade ambiental, estabilidade e funcionalidade sob várias condições extremas de pH e temperatura (PEREIRA et al. 2013; JAIN et al. 2013; GUDIÑA et al. 2015). Em um estudo conduzido por Dubey et al. (2012), *Pseudomonas aeruginosa* e *Kocuria turfanensis* produziram um biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial e emulsificar um agrotóxico estável sob uma variação de pH de 2 a 11 e a uma temperatura de 60°C. Devido às suas propriedades emulsificantes, umectantes, solubilizantes e detergentes, os biossurfactantes apresentam diversas aplicações, tais como, a recuperação de petróleo, a degradação de hidrocarbonetos em solos, a remoção de metais pesados a partir de solos contaminados, a biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos, como emulsificantes de herbicidas e agrotóxicos, entre outros (GEYS et al., 2014; REBELLO et al., 2014).

A maioria das pesquisas sobre biossurfactantes tem sido realizada utilizando bactérias e leveduras (al-BAHRY et al., 2013, GUDINÃ et al., 2015, MOUAFI et al., 2016). Em um estudo realizado por Joshi et al. (2015), a cepa *Bacillus licheniformis* R2 produziu um biossurfactante com tensão superficial de 28 mN m<sup>-1</sup>, estável em altas temperaturas (85°C por 90 dias), em alta salinidade (NaCl 10%) e em uma ampla faixa de pH (5-12). A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficazes, trata-se de um lipoheptapeptídeo (biossurfactante lipopeptídico) produzido por

*Bacillus subtilis* que pode reduzir a tensão superficial (TS) da água até  $27 \text{ mN m}^{-1}$ , com CMC abaixo de  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  e alta atividade emulsionante (GUDIÑA et al., 2013). Os biossurfactantes produzidos por diferentes fungos filamentosos também têm sido relatados por alguns cientistas (QAZI et al. 2013; QAZI et al. 2014). Os fungos filamentosos são considerados como “mini-biofábricas” eucarióticas, com uma dinâmica muito vasta de produção de muitos produtos biotecnológicos importantes industrialmente, incluindo enzimas comerciais, ácidos orgânicos, alcaloides, reguladores de crescimento de plantas, antibióticos, polissacarídeos e pigmentos. Levando em consideração a importância dos fungos para obtenção de bioprodutos, Qazi et al. (2014) caracterizou um biossurfactante produzido pelo fungo filamentoso *Fusarium* sp. BS-8, que reduziu a tensão superficial a valores menores que  $32 \text{ mN m}^{-1}$ , utilizando sacarose como substrato, temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e pH 7.0. Um glicolípido da subclasse manosileritritol-lípido (MEL) que reduziu a tensão superficial para  $25.2 \text{ mN m}^{-1}$  foi produzido pela cepa fúngica *Ustilago scitaminea* NBRC 32730, utilizando suco de cana como substrato (MORITA et al. 2011). Em outro estudo, o fungo *Aspergillus flavus* produziu um biossurfactante chamado Uzmaq, composto pelo glicosídeo metoxi-fenil-oxima (ISHAQ et al. 2015).

### 1.1.7 Produção de biossurfactantes por processos fermentativos

Apesar dos biossurfactantes apresentarem uma série de vantagens para o ambiente se comparados aos surfactantes químicos, das quais se destacam a redução de contaminação com agentes químicos e xenobióticos do ambiente, eles ainda não são utilizados extensamente na indústria devido aos baixos rendimentos de fermentação e ao seu relativo alto custo de produção (PAL et al. 2009; JOICE; PARTHASARATHI, 2014). A produção da maioria dos produtos microbianos é complexa, envolvendo um processo não linear. Ao longo desse processo, o meio de fermentação influencia no controle do rendimento e especificidade do produto. Desse modo, em processos fermentativos a otimização do meio de cultivo é reconhecida como uma ferramenta para o aumento da produção do produto desejado. O crescimento de células e a acumulação dos produtos metabolizados são fortemente influenciados pelos componentes do meio de fermentação, tais como fonte de carbono, fontes de nitrogênio, fatores de crescimento da cultura e adição de sais inorgânicos. Os fatores de crescimento ambientais, tais como condições de pH,

temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes (JOICE;PARTHASARATHI, 2014). Tanto os processos de fermentação submersa, quanto à fermentação em estado sólido são reconhecidos como métodos biotecnológicos para a produção de biossurfactantes.

Normalmente os biossurfactantes são produzidos por microrganismos durante o crescimento em substratos hidrofóbicos. No entanto, alguns fungos são capazes de produzir biossurfactantes na presença de diferentes tipos de substratos, tais como carboidratos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura e as propriedades do biossurfactante produzido. Com isto, pode-se alterar a fonte de carbono de acordo com as características desejadas no biossurfactante. Em um estudo conduzido por Pal et al. (2009), a sacarose foi a fonte de carbono mais promissora se comparada a glicose, sorbitol, manitol e glicerol, visando a otimização do meio de cultura para a produção de um biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis*. A habilidade de *P. aeruginosa* em utilizar diferentes tipos de fontes de carbono para a produção de biossurfactantes foi testada com glicerol, petróleo bruto, óleo de palma, azeite de oliva e óleo de soja. Dentre essas fontes de carbono, o glicerol produziu a menor tensão superficial (HAMZAH et al. 2013). O glicerol é um ácido graxo simples, com elevada solubilidade no meio, de modo que é facilmente utilizado por bactérias como fonte de carbono e energia. Kiran et al. (2009) relataram que a suplementação de glicose como fonte de carbono aumentou em 35% a produção de um biotensioativo pelo fungo *Aspergillus ustus*. No estudo conduzido por Mouafi et al. (2016), a máxima produção de biossurfactantes por *Bacillus brevis* ocorreu com a utilização da máxima concentração (8,5%) de glicose.

A fonte de nitrogênio também possui um papel importante na produção de biossurfactantes pelos microrganismos, pois é um componente das proteínas, que são essenciais para o crescimento dos microrganismos e para a produção de biossurfactantes no meio de fermentação. Em um estudo conduzido por Kiran et al. (2009), a suplementação do meio de fermentação com extrato de levedura (25%) e  $\text{NaNO}_3$  (10%) resultou no aumento da produção do biossurfactante pela espécie fúngica *Aspergillus ustus*. Joice e Parthasarathi (2014) realizaram um estudo para otimizar a produção de um biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, onde o nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) foi a melhor fonte de N para o crescimento do microrganismo e também para a produção do biossurfactante, o qual reduziu a tensão superficial para  $30 \text{ mN m}^{-1}$ . A limitação de nitrogênio tem sido relatada como



propícia para o aumento de produção de ramnolipídeos. Neste estudo em particular, a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* foi dependente da fonte de carbono utilizada e também da limitação de nitrogênio. No entanto, diversos outros estudos para a mesma espécie, utilizando outras condições de crescimento e diferentes meios de cultura resultam em uma produção bastante distinta de ramnolipídeos.

Os fatores ambientais são extremamente importantes na produção e características do biossurfactante produzido. A fim de obter grandes quantidades de biossurfactantes é necessário otimizar as condições do processo, pois a produção do biossurfactante é afetada por variáveis como pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação. Korayem et al. (2015) estudaram a produção de um biossurfactante por *Streptomyces*, o maior índice de emulsificação (42%) foi obtido com pH 6.0, temperatura de 35°C, agitação de 150 rpm e período de incubação de 3 dias. Já no estudo conduzido por Bueno et al. (2010), a melhor condição de produção de um biossurfactante por *Bacillus pumilus* foi obtida com pH entre 5.0 e 7.0, com 72 h de fermentação, havendo nessa condição maiores porcentagens de índice de emulsificação e também melhores reduções da tensão superficial.

A baixa tensão superficial é uma característica requerida para biomoléculas com propriedades surfactantes. Colla et al. (2010) avaliaram ao longo de 6 dias que a tensão superficial do meio de cultura diminuiu de 50 mN m<sup>-1</sup> para 28 mN m<sup>-1</sup> devido a um biossurfactante produzido por *Aspergillus* spp. Os maiores índices de emulsificação e a maior redução da tensão superficial foram obtidos na fase estacionária do crescimento do microrganismo, o que ocorreu a partir do segundo dia de fermentação. Segundo os autores, em condições de limitação de nutrientes, a velocidade de crescimento diminuiu, mas o carbono permaneceu sendo transportado para as células do microrganismo, sendo usado para a biossíntese de lipídeos. Resultado similar foi encontrado por Kiran et al. (2009), os quais relataram que a maior atividade biossurfactante foi detectada após 72 h de fermentação, não sendo observada atividade biossurfactante do início até a metade da fase exponencial. No entanto, o pico da produção do biossurfactante foi observado no final da fase exponencial e continuou até a fase estacionária.

Uma das limitações para a obtenção dos biossurfactantes por processos fermentativos é a possibilidade da produção de homólogos de biossurfactantes no meio de cultivo (SANTOS et al., 2016). Diversos homólogos de biossurfactantes são produzidos por diferentes microrganismos (SAHARAN et al., 2011; SANTOS et al.,

2016). Por exemplo, a estrutura geral da surfactina é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácidos graxos, a qual varia entre 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (LANG, 2002). Estudos indicam que a produção dos homólogos de biossurfactantes é dependente das condições de produção utilizadas. Segundo Slivinski et al. (2012), a produção de homólogos da surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 foi dependente da temperatura de incubação. A surfactina produzida por *B. pumilus* UFPEDA 448 é uma mistura de cinco homólogos, com o número total de átomos de carbono na cadeia do ácido graxo variando de 12 a 16. A maior diferença na produção de homólogos ocorreu a 45° C, nesta temperatura, o homólogo C16 não foi detectado, enquanto o homólogo C14 atingiu o nível máximo de produção no período de 36 h. No entanto, em temperaturas mais baixas os dois homólogos foram produzidos.

Como visto, diversos estudos indicam a influência de fatores como pH, temperatura, suplementação de nutrientes, tempo de fermentação, agitação e aeração no crescimento do microrganismo e na produção de biossurfactantes. Assim, é possível observar que cada microrganismo responde de uma maneira específica a estas variáveis. Um dos maiores desafios na produção de biossurfactantes diz respeito à necessidade de otimizar as condições de crescimento para cada microrganismo e biossurfactante a ser produzido.

### **1.1.8 Aplicações dos biossurfactantes**

Os surfactantes podem ser utilizados na elaboração de detergentes domésticos, herbicidas ou agrotóxicos, como agentes de biorremediação, na indústria têxtil, de papel, de petróleo, farmacêutica, de processamento de alimentos, entre outras (MOUAFI et al., 2016). Na área agrícola, os surfactantes são utilizados como adjuvantes de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Os surfactantes sintéticos usados em indústrias de agrotóxicos atuam como dispersantes, emulsionantes, espalhantes e agentes de molhamento para aumentar a eficiência dos agrotóxicos. No entanto, o excesso de surfactantes utilizados em formulações com pesticidas pode persistir no solo por longos períodos, ou lixiviar para águas subterrâneas afetando a textura, a cor e o crescimento das plantas (KORAYEM et al., 2015). Considerando os efeitos adversos dos pesticidas e tensoativos associados a

pesticidas, há uma crescente necessidade de substituir os surfactantes sintéticos por biossurfactantes ambientalmente seguros.

Por isto, nos últimos anos têm crescido o interesse comercial por biossurfactantes, devido principalmente à diversidade química desses compostos, a redução dos impactos ambientais, a possibilidade da produção em larga escala, a seletividade, o desempenho sob condições extremas e o potencial de aplicação (MARCHANT; BANAT, 2012). No entanto, o uso de biossurfactantes na agricultura ainda é escasso (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

A surfactina é um lipopeptídeo com potencial para ser usada como biossurfactante na agricultura, além de apresentar propriedades antifúngicas, antivirais, antitumorais e inseticidas, podendo ser utilizada como agente de biorremediação para tratamento da água e do solo (MULLIGAN, 2005). Recentemente, uma nova cepa da levedura *Candida kuoi* foi identificada como produtora de quantidades significativas de soforolipídeos com potencial para serem utilizados como herbicidas de pós-emergência, podendo diminuir ou até mesmo substituir o uso do glifosato e da DL-fosfotricina (KURTZMAN, 2012; PRICE et al., 2012). Várias cepas de *Bacillus* foram identificadas como produtoras de uma ampla gama de biossurfactantes, tais como iturina, surfactina, bacilomicina, fengicina, etc. Em um estudo conduzido por Ghribi et al. (2012), a cepa *Bacillus subtilis* SPB1 foi identificada como produtora de um biossurfactante com atividade larvicida, a  $LC_{50}$  contra larvas de terceiro estágio de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) foi  $257 \text{ mg g}^{-1}$ , seis dias após o tratamento. Além disso, os biossurfactantes da classe dos ramnolipídeos produzidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* são comercializados pela Jeneil Biosurfactant (EUA) principalmente como fungicidas para fins agrícolas ou como aditivos para biorremediação (BANAT et al. 2010).

Além destes, outros biopesticidas à base de biossurfactantes estão disponíveis no mercado, um deles é o Serenade da AgraQuest Inc. (EUA) (empresa recentemente adquirida pela Bayer Crop Science), que é um fungicida que contém *Bacillus subtilis* (Cepa QST 713). Esse microrganismo produz 30 lipopeptídeos que sinergicamente destroem patógenos de plantas. O outro é o Zonix, um fungicida à base de ramnolipídeos da Jeneil Biotech Inc. (EUA). O qual protege certas culturas agrícolas da ação de microrganismos patógenos zoospóricos de diversos gêneros, como *Alchlya*, *Albugo*, *Aphanomyces*, *Basidiophora*, *Olpidium*, *Plasmopara*, *Sclerospora*, etc. (KOSARIC; SUKAN, 2014).

A atividade inseticida de ramnolipídeos isolados a partir de *Pseudomonas* EP-3 no controle do pulgão-verde do pessegueiro (*Myzus persicae*) foi relatada por Kim et al., (2011). O sobrenadante da *Pseudomonas* EP-3 cultivada em meio contendo glicose como substrato causou mortalidade maior que 80% em afídeos até 24 h após o tratamento. A dose utilizada para a mortalidade de 50% e de 100% dos afídeos foi de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, causada principalmente pela ocorrência de danos à cutícula. Além disso, os biossurfactantes são utilizados para aumentar a emulsificação ( $90 \pm 2\%$ ) e para aumentar a solubilização dos agrotóxicos hidrofóbicos, como o metil paration, o etil paration e a trifluralina (WATTANAPHON et al., 2008). Os biossurfactantes também podem ser utilizados como agentes de penetração e de transporte em formulações de , inseticidas e herbicidas (AWADA et al., 2010). Nesse estudo, a adição de ramnolipídeos ao inseticida solúvel em água Acefato proporcionou o controle da solubilidade do mesmo, enquanto a adição de ramnolipídeos ao inseticida insolúvel em água Imidacloprido aumentou a solubilidade e a translocação do inseticida na planta tratada. Em outro estudo, os sofrorolipídeos e seus derivados foram utilizados como adjuvantes na formulação de agrotóxicos (GIESSLER-BLANCK et al., 2012).

Os adjuvantes são substâncias não ativas sobre os alvos (doenças, plantas daninhas e pragas), mas que aumentam a efetividade dos ingredientes ativos em uma formulação. Quando sofrorolipídeos foram utilizados como adjuvantes de um fungicida (epoxiconazole), proporcionaram um aumento de 53% na eficiência do mesmo. Os biossurfactantes também podem ser aplicados na agricultura para solubilizar nutrientes das formulações de fertilizantes, ajudando as plantas a assimilarem os nutrientes mais efetivamente (KOSARIC; SUKAN, 2014).

Outra utilização dos biossurfactantes é na remoção de resíduos de agrotóxicos/inseticidas de vegetais e frutas. Cheowtirakul e Linh (2010) relataram a aplicação de ramnolipídeos como agentes removedores de resíduos de inseticidas de folhas de alface. Os resultados desse estudo demonstraram que 25 ppm de ramnolipídeos foram capazes de reduzir a concentração do agrotóxico cipermetrina de 100 para 2 ppm em 5 minutos.

A grande importância e aplicabilidade dos biossurfactantes faz com que aumente a prospecção por novas moléculas a partir dos recursos naturais. Recentemente, os biossurfactantes têm recebido grande atenção na área de nanobiotecnologia médica (RODRIGUEZ et al., 2010; SOLANKI et al., 2010). Essas

moléculas de origem microbiana apresentam propriedades antifúngicas e antivirais, inibem o crescimento de tumores e apresentam menores efeitos tóxicos, causam menos alergias e com isso podem ser usados como agentes adesivos, em vacinas e na terapia genética.

## 1.2 HIPÓTESES

A produção de quitinases pelo fungo *Metharizium anisopliae* pode ser aumentada pela otimização do meio de crescimento;

Os microrganismos isolados de amostras de solo contaminadas com hidrocarbonetos podem ser bons produtores de biossurfactantes, quando o seu cultivo é otimizado.

## 1.3 OBJETIVO GERAL

Obter quitinases e biossurfactantes a partir do cultivo otimizado dos microrganismos em processos fermentativos.

## 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção das quitinases pelo fungo *Metharizium anisopliae* quando cultivado em fermentação em estado sólido e meios de cultivo industriais;
- Isolar e identificar através de técnicas moleculares os microrganismos produtores de biossurfactantes obtidos de amostras de solo do Bioma Pampa;
- Selecionar através de experimentos de bancada o microrganismo com maior potencial de produção destes bioprodutos;
- Otimizar a produção dos biossurfactantes pelo fungo selecionado quando cultivado em meios industriais;
- Otimizar protocolos de extração e purificação dos biossurfactantes e realizar a identificação da estrutura química destas moléculas.

## 2 ARTIGO 1 – PRODUCTION OF CHITINASE FROM *METARHIZIUM ANISOPLIAE* BY SOLID STATE FERMENTATION USING SUGARCANE BAGASSE AS SUBSTRATE

### Abstract

In this study was optimized the solid-state fermentation for production of chitinases enzymes by the fungal *Metharizium anisopliae*. The total chitinolytic activity was determined using sugarcane bagasse as substrate. A Central Composite Rotatable Design (CCRD) was used to determine the most significant variables in the fungal enzyme production by solid state fermentation. The evaluated variables were the temperature (28 to 38°C), moisture content (43 to 77%) and chitin mass (0.3 to 1.2 g). The highest value for the total chitinolytic activity was obtained using colloidal chitin and sugarcane bagasse as fermentation medium reaching the value of 6.78 U.g<sup>-1</sup>. The fungal *M. anisopliae* showed to be a promising strain for production of chitinolytic enzymes in bioreactors, using a residue of low cost such as sugarcane bagasse.

**Key words:** Biological control, enthomopatogenic fungal, chitinolytic fungal, enzymes, growth medium.

### Introduction

Fungi have been recognized by their ability to secrete several enzymes. Fungal chitinolytic enzymes have important biotechnological applications in agriculture to control plant pathogens. Chitin, a high molecular weight and insoluble homopolymer of N-acetylglucosamine (GlcNAC), is a major component of the insect cuticle (Hamid et al., 2013). The enzymes that can fully degrade chitin into N-acetylglucosamine monomers are divided into N-acetylglucosaminidases [EC3.2.1.52, Glycoside hydrolase (GH) family 20] and chitinases (EC3.2.1.14, GH family 18 and 19).

Chitinases can be used in the management of agricultural pests and in a variety of applications such as in medicine, in biochemical bioprocessing engineering, in waste management (Patil and Jadhav, 2014). Moreover, the use of chitinase as bioinsecticide through fermentation processes can contribute to reducing indiscriminate use of pesticides in agriculture (Dahiya et al., 2006).

The production of large-scale chitinases are widely dependents of key factors such as cost production, self-life stabilities and improvement in enzyme properties by immobilization (Daizo, 2005). Solid-state fermentation has employed to increasing

the chitinase production, due to several advantages over conventional submerged fermentation (Suresh et al. 2011). Different types of chitin substrates as shrimp shells and agricultural residues have been reported for the chitinases production (Karthik et al., 2014).

The *Metarhizium anisopliae* is a well-characterized filamentous fungus used in the biological control of agricultural and livestock pests, and disease vectors. (Roberts and St. Leger, 2004; Isaka et al. 2005). In addition, the enzymes from *Metarhizium* spp. are frequently exploited as industrial catalysts (Pereira et al. 2007; Silva et al. 2009). Optimization of culture media is very important to maximize the yield and productivity of enzyme, and minimize the cost of production. Therefore, the aim of this study was to determine optimized conditions for maximum chitinases production by the fungal *M. anisopliae* in solid-state fermentation systems using sugarcane bagasse as substrate.

## Material and Methods

### Microorganism

*M. anisopliae* strain E6, originally isolated from *Deois flavopicta* (Hemiptera: Cercopidae) in Espírito Santo state, Brazil, was previously assessed as very virulent strain against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon et al., 2000).

### Solid substrate

Sugarcane bagasse was obtained in a micro distillery of bioethanol production. In the laboratory, the residue was dried at 60°C during 24 hours, grounded in a cutting mill and sieved with final particle size of 8 mesh.

### Preparation of colloidal chitin

Colloidal chitin was prepared as described by Liu et al. 2014. Firstly, 4 g of practical grade chitin (Sigma, Aldrich) was suspended in 40 mL (v/w) of 37% (v/v) HCl and mixed for 50 min. Then, 1L of ice-cold water was added dropwise. After

centrifugation, the pellet was collected and washed with distilled water until the pH of the washing water reached 5.0.

#### Production of chitinolytic enzymes and their assays

The fermentations were carried out in conical flasks (200 mL) containing 5 g of sugarcane bagasse. The moisture content was adjusted at specified level in the solid substrate, as described below. Each flask was covered with hydrophobic cotton and autoclaved at 121°C for 20 min. After cooling, each flask was inoculated with 1 mycelium discs (3 mm diameter) and incubated for 96 h.

Based on preliminary tests and from literature, a central composite rotational design (CCRD) for three independent variables was conceived to investigate the influence of temperature of incubation (28 to 38°C), moisture content of sugarcane bagasse (43 to 77%) and chitin mass (0.3 to 1.2 g) on chitinolytic enzymes production by *M. anisoplieae*.

#### Extraction of the chitinolytic enzymes and assays

At the end of fermentation, the chitinolytic enzymes were extracted using 100 mL of distilled water in an orbital shaker at 120 rpm and 28°C during 1 hour. Afterwards, 30 mL of the enzyme extract was withdrawn for determination of enzymes activities.

Chitinolytic activity was measured using 1 mL of diluted enzyme extract in 2 mL of a 3.5% (m/v) colloidal chitin in a 50 mM phosphate buffer (pH 5.2), and the reaction were carried out at 37°C during 60 min. For all enzyme activity measurements, a standard without substrate was carried out to subtract the initial amount of reducing sugars (RS). Reducing sugars were measured by the spectrophotometric DNS method, using N-acetylglucosamine (GlcNAC) as standard for chitinase activity. In all cases the absorbance of samples were measured at 540 nm (Miller, 1959). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which forms 1  $\mu\text{mol}$  of N-acetylglucosamine per min under assay conditions ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ).



## Statistical analysis

All the results were analyzed using the software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90%.

## Results and Discussion

Table 1 presents the results in terms of chitinase activities obtained in the 17 runs CCRD. The mean chitinase activity obtained in the 17 runs of the CCRD was  $5.02 \text{ U.g}^{-1}$ . The highest chitinase activity ( $6.78 \text{ U.g}^{-1}$ ) was obtained in experiment 15, for temperature of  $33^\circ\text{C}$ , chitin mass of  $0.75\text{g}$  and moisture content of  $60\%$ , all factors at the level (0), followed by the experiment 10 ( $6.40 \text{ U.g}^{-1}$ ). It is important to highlight that the best results in terms of chitinase activity were obtained in the runs where temperature was higher than  $33^\circ\text{C}$ , while chitin concentration at lower level. This result is similar to that obtained by Jenifer et al. (2014), where a chitinase produced by *Trichoderma viride* N9 was most activity at  $40^\circ\text{C}$ , suggesting higher chitinolytic activity at elevated temperatures.

Table 1. Independent and dependent variables in CCRD related with chitinolytic activity using sugarcane bagasse as substrate.

Run	T ( $^\circ\text{C}$ )	M (% wt)	C (% $\text{m m}^{-1}$ )	$C_A$ ( $\text{U.g}^{-1}$ )
1	30 (-1)	50 (-1)	0.5 (-1)	3.06
2	36 (1)	50 (-1)	0.5 (-1)	5.94
3	30 (-1)	70 (1)	0.5 (-1)	3.55
4	36 (1)	70 (1)	0.5 (-1)	5.94
5	30 (-1)	50 (-1)	1.0 (1)	6.32
6	36 (1)	50 (-1)	1.0 (1)	5.78
7	30 (-1)	70 (1)	1.0 (1)	3.88
8	36 (1)	70 (1)	1.0 (1)	3.76
9	28 (-1.68)	60 (0)	0.75 (0)	6.36

10	38 (1.68)	60 (0)	0.75 (0)	6.40
11	33 (0)	43 (-1.68)	0.75 (0)	3.00
12	33 (0)	77 (1.68)	0.75 (0)	3.13
13	33 (0)	60 (0)	0.3 (-1.68)	6.20
14	33 (0)	60 (0)	1.2 (1.68)	3.14
15	33 (0)	60 (0)	0.75 (0)	6.78
16	33 (0)	60 (0)	0.75 (0)	6.14
17	33 (0)	60 (0)	0.75 (0)	6.04

T - temperature; M – moisture content; C – chitin mass; C<sub>A</sub> - chitinase activity.

The activities obtained here are in good agreement with other studies reported in literature. Rustiguel et al. (2012) obtained a chitinase activity of *M. anisopliae* ranging from 0.5 to 1.5 U.g<sup>-1</sup> for different strains with an incubation time of 4 days and 48% moisture. This result is about six times lower than that obtained in our study in similar conditions. Furthermore, chitinase production by the *M. anisopliae* under optimized conditions was two times higher than that observed for the production by *Trichoderma harzianum* (3.14 U.g<sup>-1</sup> of substrate) under SSF using a mixture of colloidal chitin and wheat bran as substrate, after 96 h of incubation at 30°C (Nampoothiri et al., 2004). In a study conducted by Farag and Al-Nusarie (2014) the best substrate for maximum chitinase production (4.82 mg.g<sup>-1</sup>protein) by chitinolytic fungi *Aspergillus terreu* isolated from different soil samples was shrimp-shell powder (2%). Mustafa and Kaur (2009) observed a wide variation in the production of extracellular enzymes from 12 stains of *M. anisopliae*, mainly due to ability of the fungus to secrete enzymes according to the composition of the cuticle. For Freimoser et al. (2003) *M. anisopliae* is able to produce different forms of chitinase according to the substrate used.

Usually in SSF, optimum moisture content for growth and substrate utilization was found to vary between 40 and 70%, depending on the organism and substrate for cultivation (Pandey, 1992). In a study conducted for Rattanakit et al. (2002) the utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13 was investigated and the addition of 58-65% water (w/w) to the medium was effective in enhancing production chitinolytic enzymes. Prakash Bhanu

et al. (2008) reported that moisture content of 22.34% was optimum for production of *Metarhizium anisopliae*, when rice was used as a substrate.

The influence of the independent variables growth time and medium humidity on chitinase production by four strains of *M. anisopliae* was analyzed by Rustiguel et al. (2012). Both variables showed a positive effect on the production of extracellular chitinase for all strains, regarding an increase in the enzymatic levels. The Pareto chart for the enzyme production shows that the linear variable time of growth has a positive effect on the enzyme production, but very long periods of time already have a negative effect. The linear variable moisture shows that the addition of tap water is favorable for chitinase production, but too much water turns the production into negative.

Data of Table 1 were used to determine the effects of the studied variables on the chitinase activity using sugarcane bagasse as substrate. Fig. 1 presents the effects, in the form of Pareto chart, of the studied variables on the chitinase production. Quadratic effects for moisture content and chitin concentration, interaction effect between temperature and chitin concentration and between moisture content and chitin concentration were statistically significant, all of them positives, with 89% of significance ( $p < 0.11$ ). The negative signs of quadratic terms for chitin and moisture content are indicating the presence of a maximum point in the studied range. This explain the fact that linear terms for these variables were not significant, because the increase from the level -1 to +1 of the CCRD doesn't lead to an increase in the enzyme production. In a study conducted by Patil and Jadhav (2014) the chitinase activity of *Penicillium ochrocloron* increased with increase in chitin concentration but after optimum level, it was decreased. The probable reason could be the end products might repress chitinase activity.

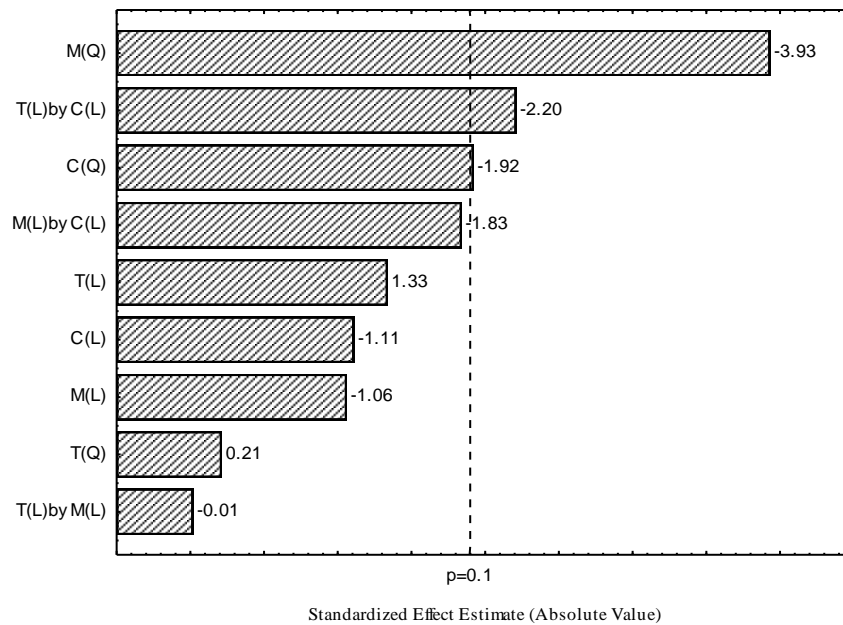


Figure 1. Pareto chart expressing the effects of process variables on the enzymatic hydrolysis optimization under CCRD. C – chitin mass; T – temperature incubation; M – moisture content, L - linear effect, Q - quadratic effect

However, the determination of this maximum (optimum) point (or range) only is possible after a graphical interpretation of the results. For this reason, data of Table 1 were used to estimate the parameters of quadratic model that is presented in Eq. 1, considering only the significant terms ( $p < 0.11$ ):

$$C_A = 6.31 - 11.1 \cdot M^2 - 0.54 \cdot C^2 - 0.74 \cdot T \cdot C \quad (1)$$

where  $C_A$  is the chitinase activity ( $U \cdot g^{-1}$ ), C, T and M are the coded chitin concentration, temperature and moisture content, respectively. This model was validated by analysis of variance (ANOVA), presenting a calculated F-test 1.3 times higher than the table one and a determination coefficient ( $r^2$ ) of 0.8171. This enables the use of model to predict the activities within the studied range.

Figure 2 presents the influence of independent variables on the production of chitinase by solid-state fermentation. Figure 2a is referring to influence of temperature and chitin concentration, where it is possible to note that optimum activity can be achieved in two distinct regions, one of high temperature and low chitin concentration and other at high chitin concentration and low temperature. Regarding the effects of moisture and chitin (Figure 2b), the best results were

obtained at the central point for both variables, whereas in contour plots for moisture and temperature (Figure 2c), high chitinase activity were obtained at the central point and higher values, respectively.

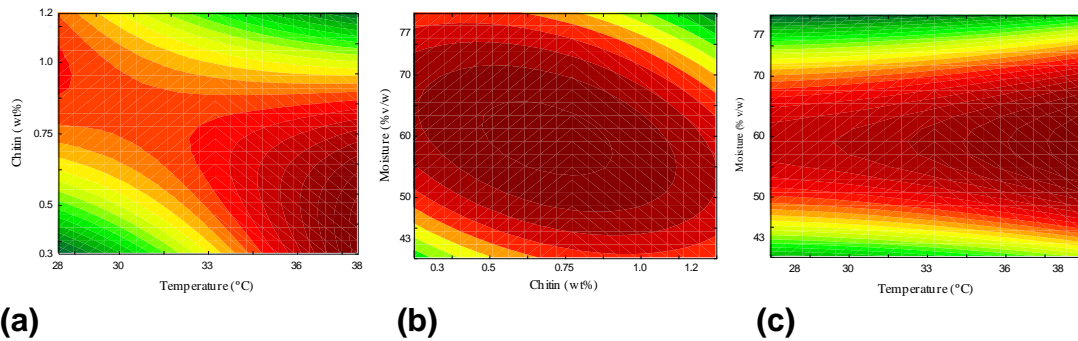


Figure 2. Contour plots for optimization using sugarcane bagasse as substrate for chitinolytic enzyme production: (a) chitin x temperature, (b) moisture x chitin, (c) moisture x temperature.

The results obtained in this work demonstrate that the highest value for the total chitinolytic activity reaching the value of  $6.78 \text{ U.g}^{-1}$ . This result was obtained in experiment 15, for temperature of  $33^\circ\text{C}$ , chitin mass of  $0.75 \text{ g}$  and moisture content of  $60\%$ , all factors at the level (0) of the CCRD. The best results in terms of chitinase activity were obtained in the runs where temperature was higher than  $33^\circ\text{C}$ , while chitin concentration at lower level. The fungal *M. anisopliae* showed to be a promising strain for production of chitinolytic enzymes in bioreactors. Furthermore, the results suggest that the enzymatic pool produced by *M. anisopliae* under solid state fermentation using sugarcane bagasse as substrate can be employed in future studies for the biopesticides production para controle de lagartas-praga da cultura da soja .

## References

- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S., 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes a review. *Appl Microb Biotechnol.* 71, 773-782.
- Daizo, K. 2005. Application of chitinase in Agriculture. *J. Metals Mater. Min.* 15, 33-36.

- Jenifer, S., Jeyasree, J., Laveena, K., Manikandan, K., 2014. Purification and characterization of chitinase from *Trichoderma viride* N9 and its antifungal activity against phytopathogenic fungi. *World J of Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* 3, 1604-1611.
- Farag, AM., Al-Nusaire, TS., 2014. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *African J of Biotechnol.* 13, 1567-1578.
- Freimoser, FM., Screen, S., Bagga, S., Hu, G., St Leger, RJ. 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiol.* 149, 239-247.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S., 2013. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 5, 21-29.
- Isaka, M, Kittakoop, P, Kirtikara, K., Hywel-Jones, NL., Thebtaranonth, Y., 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc Chem. Res.* 38, 813–823.
- Karthik, N., Akanksha, K., Binod, P., Pandey, A., 2014. Production, purification and properties of fungal chitinases – A review. *Indian J of Exp Biol.* 52, 1025-1035.
- Karthikeyan, P., Kanimozhi, K., Senthilkumar, G., Panneerselvam, A., Ashok, G., 2014. Optimization of Enzyme Production in *Trichoderma viride* using Carbon and Nitrogen source. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3, 88-95.
- Konstantinos, G., Diomi, M., Georgi, N., Evangelos, T., Paul, C., Dimitris, K., Basil, M.J., 2003. Studies on N-acetyl-b-D-glucosaminidase produced by *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid state fermentation. *Process Biochem.* 39, 1599-1605.
- Liu, C., Lan, C., Fu, C., Juang, R., 2014. Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Int J Biol Macromol.* 69,59–63.
- Miller, GL., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 31, 426-428.
- Mustafa, U., Kaur, G., 2009. Extracellular Enzyme Production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica*, 54, 499-504.
- Nampoothiri, K.M., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., Pandey, A., 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem.* 39, 1583-1590.
- Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid state fermentations. *Process Biochem.* 27, 109-117.

- Patil, N. S., Jadhav, J. P., 2014 .Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. *International Biodeterioration & Biodegradation* 91, 9-17.
- Pereira, JL., Noronha, EF., Miller, RN., Franco, OL., 2007. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Lett Appl Microbiol.*44, 573–581.
- Perinotto, WMS., Goloa, PS., Coutinho Rodrigues, CJB., Sá, FA., Santi, L., Silva, WOB., Junges, A., Vainstein, MH., Schrank, A., Salles, CMC, Bitencourt, VREP., 2014. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence on *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 203, 189-196.
- Prakash Bhanu, G.V.S., Padmaja, V., Sivakiran, R.R., 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 99, 1530-1537.
- Rattanakit, N., Plikomol, A., Yano, S., Wakayama, M., Tachiki, T., 2002. Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solidstate cultivation of *Aspergillus* sp. S1–13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin assimilation. *J. of Bioscience and Bioeng.* 93, 550–556.
- Rustiguel, CB., Jorge, JA.,Guimarães, LHS., 2012. Optimization of the chitinase production by different *Metarhizium anisopliae* strains under solid-state fermentation with silkworm chrysalis as substrate using CCRD. *Advances in Microbiol.* 2, 268-276.
- Silva, WOB., Santi, L., Berger, M., Pinto, AFM., Guimaraes, JA., Schrank, A., Vainstein, MH., 2009. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Proc. Biochem.*44, 829–834.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48, 85–95.
- Roberts, DW., St. Leger, RJ., 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.*54, 1–70.
- Suresh, PV., Sachindra, NM., Bhaskar, N., 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *J. Food Sci. Technol.* 48, 349-356.

### 3 ARTIGO 2 – FIRST REPORT OF THE PRODUCTION OF A POTENT BIOSURFACTANT WITH A, B-TREHALOSE BY *FUSARIUM FUJIKUROI* UNDER OPTIMIZED CONDITIONS OF SUBMERGED FERMENTATION

#### Abstract

Biosurfactants have many advantages over synthetic surfactants but have higher production costs. Identifying microorganisms with high production capacities for these molecules and optimizing their growth conditions can reduce cost. The present work aimed to isolate and identify a fungus with high biosurfactant production capacity, optimize its growth conditions in a low cost culture medium, and characterize the chemical structure of the biosurfactant molecule. The fungal strain UFSM-BAS-01 was isolated from soil contaminated with hydrocarbons and identified as *Fusarium fujikuroi*. To optimize biosurfactant production, a Plackett-Burman design and a central composite rotational design were used. The variables evaluated were pH, incubation period, temperature, agitation and amount of inoculum in a liquid medium containing glucose. The partial structure of the biosurfactant molecule was identified by nuclear magnetic resonance spectrometry. *F. fujikuroi* reduced surface tension from 72 to 20 mN m<sup>-1</sup> under the optimized conditions of pH 5.0, 37°C and 7 days of incubation with 190 rpm agitation. The partial identification of the structure of the biosurfactant demonstrated the presence of an  $\alpha,\beta$ -trehalose. The present study is the first report of the biosynthesis of this compound by *F. fujikuroi*, suggesting that the biosurfactant produced belongs to the class of trehalolipids.

**Keywords:** *Giberella fujikuroi*, surface tension, NMR spectroscopy,  $\alpha,\beta$ -trehalose, trehalolipids.

#### Introduction

Biosurfactants are secondary metabolites produced by microorganisms under specific growth conditions. Biosurfactants have an amphiphilic structure, enabling them to reduce surface and interfacial tension in water-oil and oil-water systems. Biosurfactants can be classified into several classes: glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, phospholipids, fatty



acids, polymeric biosurfactants and particulate biosurfactants (Cameotra et al., 2010). Their structural diversity allows biosurfactants to perform a variety of functions in the petrochemical, environmental, pharmaceutical, food, and agricultural industries, among others (Joshi et al., 2015).

Compared to synthetic surfactants, biosurfactants present lower toxicity, higher biodegradability, greater resistance to extreme environmental conditions, are produced from renewable sources and have greater ecological acceptability (Jain et al., 2013). Despite these advantages, a limitation to the industrial use of biosurfactants is their higher production costs compared to synthetic surfactants (Joice and Parthasarathi, 2014). One means of reducing these costs is to identify and use microorganisms with high production capacities for these molecules. Within the diversity of known microorganisms, few are good producers of biosurfactants. Some fungi can produce larger amounts of biosurfactants than bacteria, which is explained by their cell wall stiffness, as discussed by Bhardwaj et al. (2015).

Another way to reduce the cost of biosurfactants is to optimize growth medium conditions for the producing microorganisms. Several environmental factors influence biosurfactant yield and quality, particularly the carbon and nitrogen source, pH, aeration, inoculum quantity and incubation period (Chen et al., 2013, Mishra et al. 2012, Rahman et al., 2010). The present work aimed to isolate and identify a fungus with high biosurfactant production capacity from soil samples contaminated with hydrocarbons, to optimize its growth conditions in a low cost culture medium and to characterize the chemical structure of the biosurfactant molecule by nuclear magnetic resonance spectrometry techniques.

## **Material and Methods**

### **Fungus Isolation**

Microorganisms were isolated from 10 soil samples contaminated with hydrocarbons from mechanical workshops and fuel stations in the city of Santa Maria, RS, Brazil (29° 41 '03 "S, 53° 48' 25" W). One gram of soil was added to a mineral medium containing type B diesel [with 6% (v/v) biodiesel] as the sole source of carbon and energy. The mineral medium

had the following macronutrient composition ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0.04  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.8  $\text{NaCl}$ ; 1.0  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1  $\text{KCl}$ ; and micronutrients ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 0.1  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.425  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05  $\text{ZnCl}_2$ ; 0.015  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . The pH was adjusted to 5.8. The diesel oil ( $10 \text{ mL L}^{-1}$ ) was filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  membrane and mixed with medium that had been previously autoclaved at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  for 20 minutes. The culture medium containing the diesel oil and the soil was incubated at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and 120 rpm for 7 days. An aliquot of 1 mL was transferred every seven days to the same sterile medium and incubated under the same conditions. After seven transfers, 1 mL of the resulting medium was diluted to  $10^{-6}$  and a 0.1 mL aliquot of each dilution was added to Petri dishes containing PDA medium at pH 5.8. The plates were incubated for 96 h at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in a microbiological oven.

#### Selection of Biosurfactant-Producing Fungus

From the 10 soil samples, five isolates were obtained with different colony morphologies. The fungi were purified from sequential replicates using PDA medium. To select the best biosurfactant producers, fungi were grown in five 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid culture medium with the following composition ( $\text{g L}^{-1}$ ): 30.0 glucose; 1.0  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 6.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2.7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0012  $\text{CaCl}_2$ ; 0.00165  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0015  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and 0.0022 Na-EDTA. The vials were incubated for 6 days at 120 rpm and  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . Every two days, the culture medium samples were centrifuged at 10,000 rpm for 4 min, and the supernatant was collected for the measurement of the surface tension ( $\text{mN m}^{-1}$ ) and emulsification index. The surface tension was assessed by the pendant drop method on 10 drops of supernatant using a DSA 25E goniometer (Krüss GmbH, Hamburg, Germany). The emulsification index was evaluated by mixing 2 mL of the supernatant with 2 mL of filtered diesel oil in flat bottom test tubes and vortexing for 40 seconds. The emulsification index ( $\% \text{IE}_{24}$ ) was determined as described by Nitschke and Pastore (2006) by the division between the height of the emulsion layer and the total height of the solution, as measured by digital electronic calliper.

## Fungus Identification

The most promising fungus for the production of biosurfactants was coded as UFSM-BAS-01 and identified by partial sequencing of nuclear ribosomal DNA (nrDNA). The fungus was cultivated in potato-dextrose (PD) liquid medium, and its genomic DNA was extracted using a ZR MiniPep® ZR fungi/bacteria kit (ZymoResearch, Irvine, CA, USA). Elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) is often used to investigate the genus *Fusarium* (Divakara et al., 2014). An amplification reaction for the target fragment (~700 bp) was performed following the methods of O'Donnell et al. (1998). PCR products were purified using a GenElute PCR cleaning kit® (Sigma, St. Louis, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing of the samples was performed on the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequenced fragments were analysed using the 2.0.0b Staden package program (Staden, et al., 2003) to obtain the consensus sequence for EF-1 $\alpha$  and BLASTn was performed. The sequence was deposited in GenBank.

The phylogenetic relationships of the samples were carried out by EF region sequences aligned in the program BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) and reconstructed based on MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011) with Maximum Likelihood (ML) analysis for a total of 1,000 replicates for all reconstructions. The Tamura-Nei nucleotide substitution model with Gamma distribution was estimated using FindModel software (Posada, 1998). The sequences most related to that obtained in the present work were selected to construct a cladogram of the genus from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), including *Neonectriaradicicola* as the outgroup.

## Optimization of Biosurfactant Production

A Plackett-Burman (PB) design was used to optimize biosurfactant production by the fungus in liquid medium with glucose as the only source of carbon and energy. The variables evaluated were pH (5.0 to 7.0), incubation time (2 to 7 days), temperature (28 to 37°C), agitation (50 to 190 rpm) and amount of inoculum (1 to 3 disks of fungal mycelium). Table 1 shows the levels investigated for each variable in the PB design, comprising 12 experiments and three central points. Based on the interpretation of the results, a central composite

rotational design (CCRD) was used for the significant PB variables: incubation time (2, 5, 7, 9 and 12 days), agitation (50, 90, 120, 150 and 190 rpm) and temperature (37, 39, 42, 45 and 47 °C).

#### Biosurfactant Extraction and Purification

The fungus was cultured under the optimized conditions for 7 days. Cells were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 4 min, and the supernatant was membrane filtered with a pore size of 0.22 µm. Following Joshi et al. (2015), the cell-free supernatant was acidified to pH 4.0 using 6M HCl and held overnight for precipitation. Then, 50 mL of the supernatant, 50 mL of hexane (to remove fatty acids) and 50 mL of chloroform were added followed by an equal volume of ethyl acetate:methanol (1:4) at room temperature. A compound in the form of transparent crystals (C1) was isolated upon extraction with ethyl acetate:methanol.

The remaining extract was basified with 4M ammonium hydroxide and subjected to a new extraction procedure with the solvents chloroform, ethyl acetate and methanol (2:4). A powdery brown substance was obtained upon ethyl acetate and methanol extraction, which was subjected to a new extraction process with chloroform, ethyl acetate and n-butanol. In the fraction with n-butanol, a white crystalline (C2) compound with characteristics of sugars was isolated and subjected to nuclear magnetic resonance spectrometry, as described below.

#### NMR Spectrometry and Melting Point

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a 600 MHz nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker, Magneto Ascend 600 Console Avance III HD, Germany). The (uncorrected) melting point values of the substances were determined on a digital melting point apparatus (Microchemistry, model MQAPF-301, Brazil).

#### GC-FID/GC-MS Analysis

The samples were analysed by GC-FID and GC-MS. The autosampler used was an AOC-20is series injector (Shimadzu, Japan), the gas chromatograph coupled to the flame ionization detector (GC-FID) was a GC-2010 Plus (Shimadzu, Japan), and the gas chromatograph coupled to the mass spectrometer detector was a GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japan). The composition was elucidated by comparison with an analytical standard of methylated fatty acid ester – FAME mix standard (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Individual components were identified using their relative retention indices with the Wiley Registry of Mass Spectral Data (Palisade Corporation, Newfield, NY, USA).

#### Determination of the Critical Micellar Concentration (CMC)

The cell-free supernatant was kept overnight at room temperature. After the addition of ammonium sulphate (40% w/v), the supernatant was centrifuged at 10,000rpm for 4 min. The precipitate was extracted twice with ice-cold acetone, and the crude biosurfactant was collected as dry powder after the evaporation of the acetone. The CMC was determined by adding concentrations of 2.5 to 150 mg L<sup>-1</sup> of the crude biosurfactant in distilled water (Joshi et al., 2015).

## Results

#### Isolation, selection and identification of the fungus

From the 10 soil samples, five biosurfactant-producing isolates were obtained. In the first test, UFSM-BAS-01 was distinguished from other fungi by its higher biosurfactant production, its reduction of the surface tension of the culture medium from 72 to 52 mN m<sup>-1</sup> and its higher emulsification index (24.4%).

This isolate was identified with the help of molecular tools. Using a comparative analysis by Blastn in NCBI, the consensus sequence showed 100% similarity with two species: *Fusarium fujikuroi* (Nirenberg, 1976) and *Gibberella fujikuroi* (Sawada, 1917) (Figure 1). However, these are two names for the same fungus because *F. fujikuroi* is the anamorph phase and *G. fujikuroi* is the teleomorph phase of the same organism (Jeon et al., 2013).

Three subtypes were verified by ML analysis. *F.fujikuroi* and *G.fujikuroi* were grouped in the *F.fujikuroi* species complex, following Al-Hatmi et al. (2015), and the other two clades identified were *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. Therefore, the elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) was highly informative and was able to identify the isolate as belonging to the *G.Fujikuroi* species complex, with 99% bootstrap support. The consensus sequence was deposited in GenBank under accession number: KX574231.

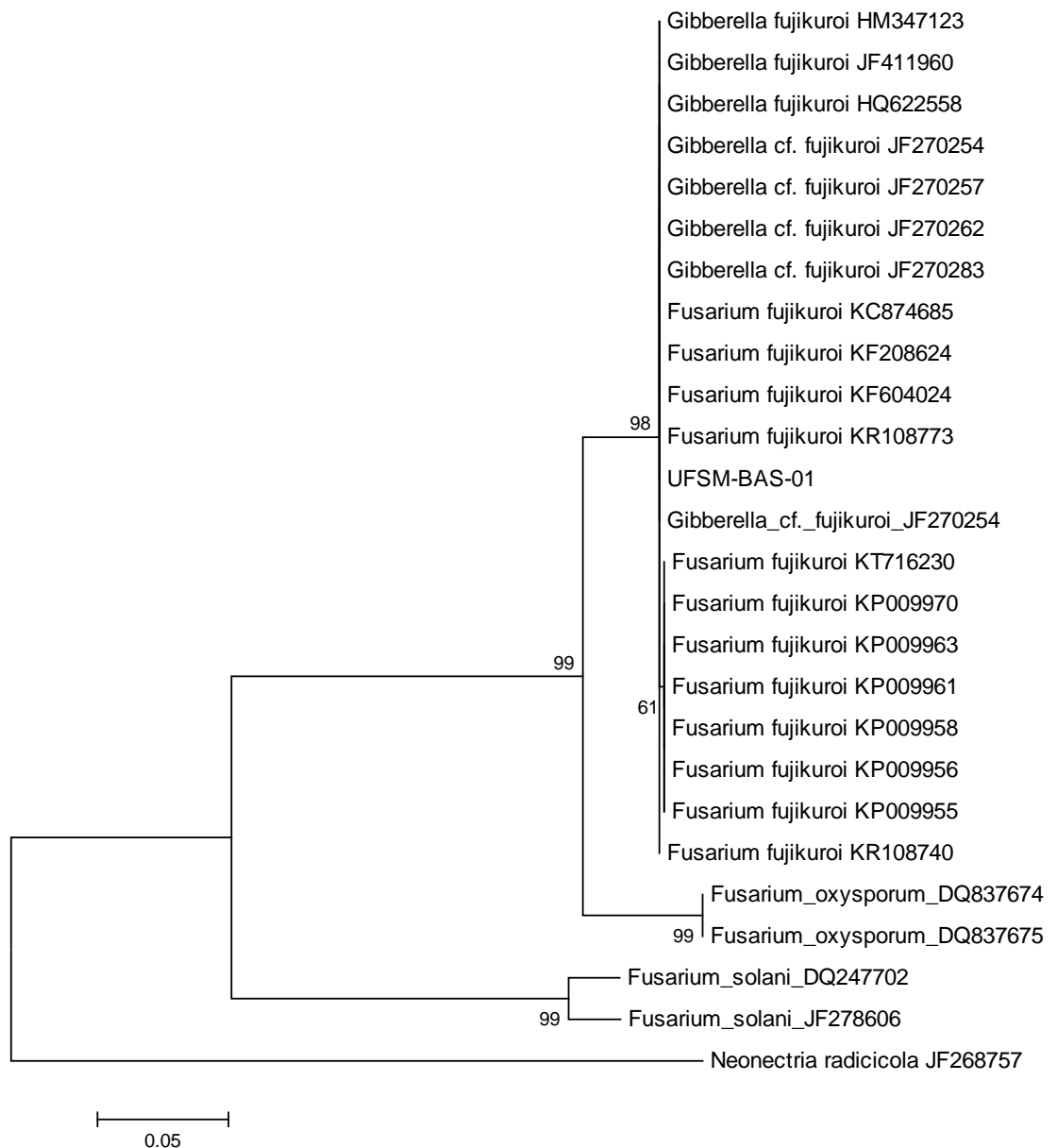


Figure 1 - Dendrogram of *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*) obtained from sequences of the Elongation Factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Maximum likelihood (ML) analysis was performed with

1,000 replicates. Bootstrap values are in percentages. *Neonectriaradicicola* was used as an outgroup.

#### Optimization of biosurfactant production

The optimization of the culture conditions for the production of a biosurfactant in mineral medium plus glucose was performed using a PB matrix (Table 1). The results were validated by analysis of variance (ANOVA) and the coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.8071. The lowest surface tension value was obtained in experiment 7 (24.08 mN m<sup>-1</sup>). The temperature, agitation and incubation time variables significantly affected the surface tension (Table 2).

Table 1. Surface tension (ST) values of the cell-free culture medium (supernatant) after the growth of the fungus *Fusariumfujikuroi* UFSM-BAS-01 under different environmental conditions, combined through a Plackett-Burman (PB) design.

Exp.	pH	Incubation (Days)	Temperature (°C)	Agitation (rpm)	Inoculum (n <sup>o</sup> of discs)	ST (mN m <sup>-1</sup> )
1	(+1) 7	(-1) 2	(+1) 37	(-1) 50	(-1) 1	46.34
2	(+1) 7	(+1) 7	(-1) 28	(+1) 190	(-1) 1	28.18
3	(-1) 5	(+1) 7	(+1) 37	(-1) 50	(+1) 3	25.47
4	(+1) 7	(-1) 2	(+1) 37	(+1) 190	(-1) 1	29.21
5	(+1) 7	(+1) 7	(-1) 28	(+1) 190	(+1) 3	29.11
6	(+1) 7	(+1) 7	(+1) 37	(-1) 50	(+1) 3	24.45
7	(-1) 5	(+1) 7	(+1) 37	(+1) 190	(-1) 1	24.08
8	(-1) 5	(-1) 2	(+1) 37	(+1) 190	(+1) 3	31.74
9	(-1) 5	(-1) 2	(-1) 28	(+1) 190	(+1) 3	41.16
10	(+1) 7	(-1) 2	(-1) 28	(-1) 50	(+1) 3	43.52
11	(-1) 5	(+1) 7	(-1) 28	(-1) 50	(-1) 1	28.39

12	(-1) 5	(-1) 2	(-1) 28	(-1) 50	(-1) 1	40.08
13	(0) 6	(0) 5	(0) 32	(0) 120	(0) 2	34.74
14	(0) 6	(0) 5	(0) 32	(0) 120	(0) 2	35.06
15	(0) 6	(0) 5	(0) 32	(0) 120	(0) 2	35.14

Table 2. Linear regression coefficients for the reduction of surface tension after the growth of the fungus *Fusarium fujikuroi* UFSM-BAS-01 under different environmental conditions, combined through a Plackett-Burman (PB) design.

Variables	Coefficients	T	p value
Average	33.11	14.27	p<0.0001
(1) pH (L)	0.82	0.54203	0.480341
(2) Incubation (L)	-6.03	29.02334	0.000440*
(3) Temperature (L)	-2.43	4.70877	0.058116*
(4) Agitation (L)	-2.06	3.40003	0.098298*
(5) Inoculum (L)	-0.06	0.00382	0.952083

\* Variables were significant with 90% confidence interval (p <0.1).

From the results obtained with the PB design, a central rotational compound (CCRD) was designed with 17 experiments to optimize the statistically significant variables from the PB matrix: incubation, temperature and agitation. In PB, the minimum value of ST was 24.08 mN m<sup>-1</sup>, while in CCRD the minimum measured value was 20.08 mN m<sup>-1</sup>, in conditions of 47°C, 120 rpm e 7 days of incubation. The highest production of the biosurfactant by the fungus *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 occurs at thermophilic temperatures, even though the fungus was isolated under mesophilic conditions.

A Pareto graph (Figure 3) represents the significant variables in the CCRD with a significance level of 90% (p <0.1). Confirming previous observations with the PB matrix, lower ST occurred at higher temperatures and longer incubation periods. However, unlike PB, the agitation variable was not statistically significant, which also justified the performance of the CCRD.



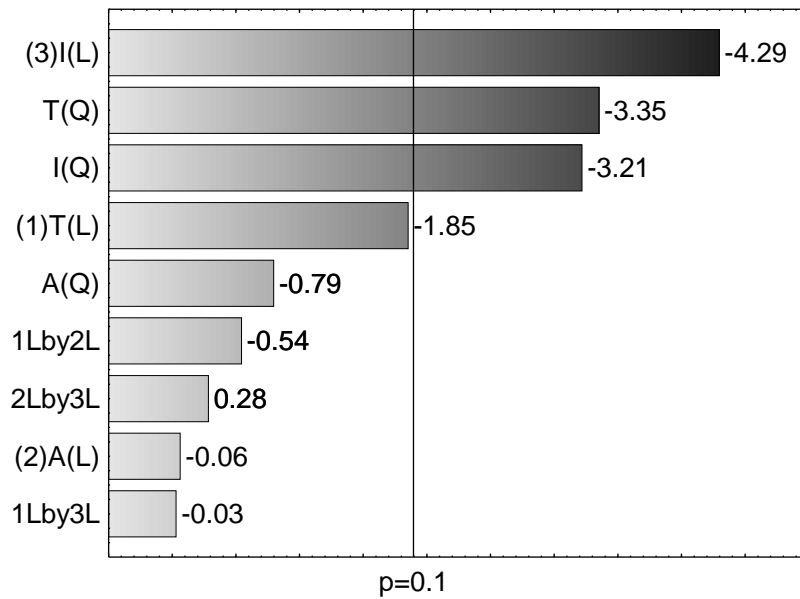


Figure 3. Pareto plot with temperature (T), agitation (A) and incubation time (I), which demonstrated statistical significance ( $p < 0.1$ ) in a central rotational compound design (CCRD) aimed at reducing the surface tension of the culture.

The following equation describes the behaviour of surface tension (ST) in response to temperature (T) and incubation time (I):

$$ST = 61.34 - 9.83 \cdot T^2 - 9.44 \cdot I^2 - 11.44 \cdot I$$

This model was validated by analysis of variance (ANOVA), and the coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.84953. A graphical representation of the optimization of biosurfactant production demonstrates that the lowest values of ST (dark green) were obtained at the positive axial point for incubation and at the central point for agitation (Figure 4a). As shown in Figure 4b, longer incubation periods and higher temperatures provided lower STs. As shown in Figure 4c, the higher the temperature and the agitation, the lower the ST of the culture medium.

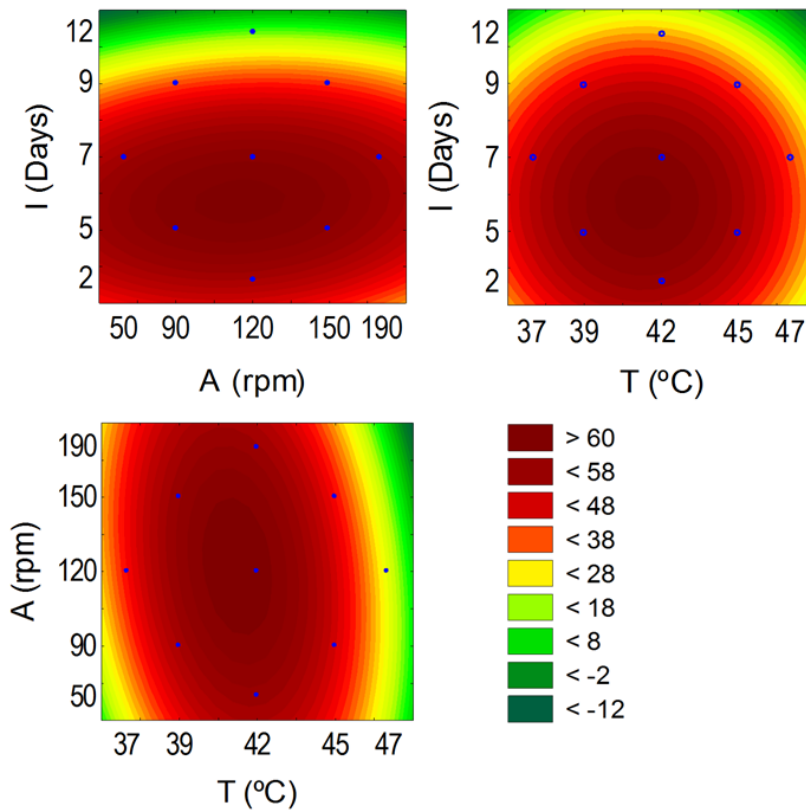


Figure 4. Contour plot of the reduction of surface tension of the growth medium by production of biosurfactants by *Fusariumfujikuroi*UFSM-BAS-01. (I) incubation period; (A) agitation; (T) temperature.

#### Determination of the CMC

A satisfactory reduction of the ST of distilled water was observed with increasing amounts of the biosurfactant (Figure 5). For biosurfactant concentrations above  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , the ST remained stable at approximately  $27 \text{ mN m}^{-1}$ . Thus, the CMC of the biosurfactant produced by *F. fujikuroi*UFSM-BAS-01 was  $\sim 30 \text{ mg L}^{-1}$ .

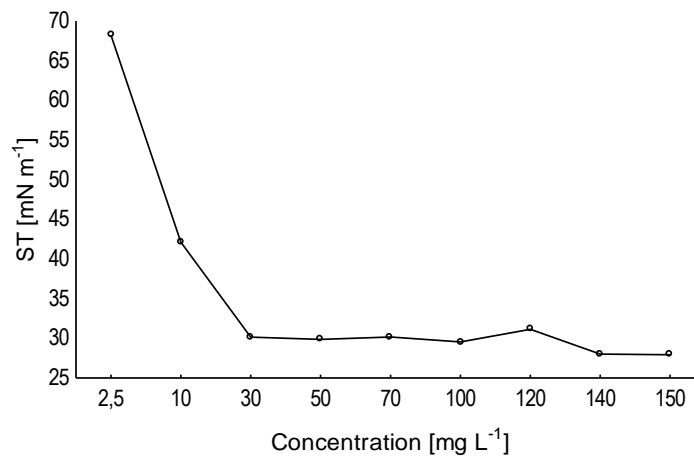


Figure 5. Surface tension (ST) of distilled water with the addition of increasing amounts of the biosurfactant produced by *Fusarium fujikuroi* UFSM-BAS-01.

#### Biosurfactant extraction, purification and identification

The solvent system formed by ethyl acetate and methanol provided a satisfactory extraction of the biosurfactant produced by *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01. The biosurfactant was extracted three times, and the second fraction yielded a compound in the form of large white crystals characteristic of sugars, from which substance C2, identified as the disaccharide  $\alpha,\beta$ -trehalose, was obtained (Koto et al., 1980). Thus, the present study is the first report of the biosynthesis of an  $\alpha,\beta$ -trehalose by *F. fujikuroi*, suggesting that the biosurfactant produced belongs to the class of trehalolipids. The Supplementary Material contains the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra for the metabolite trehalose in methanol (MeOH) at 600 MHz.

Compounds identified by GC-MS for both methanol and hexane extracts demonstrate the presence of 9-octadecenamide (oleamide), an amide derived from oleic acid, a fatty acid (Table 4). In GC-FID analysis, the methanol extract did not show evidence of any molecule with a fatty acid structure when compared with the FAME mix standard chromatogram pattern. However, the hexane extract exhibited a few molecules that can be correlated with the fatty acid pattern showed in the FAME mix standard chromatogram, such as caproic acid (41.72%) and palmitoleic acid (12.72%). Unfortunately, other peaks that

would appear in the same chromatogram were not clarified due to the lack of derivatisation of the fatty acids, which is a subject for future work.

Table 4. Volatile compounds of the hexane and methanol extracts of the biosurfactant produced by *Fusariumfujikuroi* UFSM-BAS-01 and analysed by GC-MS.

Peak	Retention time (min.)	Compounds	Area (%)
<b>Hexane</b>			
1	6.527	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine	10.89
2	7.605	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	14.76
3	8.770	2-furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)	33.87
4	8.957	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	21.53
5	21.084	9-Octadecenamide	18.95
<b>Methanol</b>			
1	9.962	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl- (cas)	5.36
2	12.250	Tetradecamethylcycloheptasiloxane	4.90
3	18.525	Urea, n,n'-dicyclohexyl- (cas)	17.99
4	21.085	9-Octadecenamide	33.09
5	22.572	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro- (cas)	38.66

## Discussion

The fungus UFSM-BAS-01 can be considered an efficient producer of biosurfactant. According to the literature, STs in the range of 35 to 40 mN m<sup>-1</sup> indicate a microorganism that is promising for biosurfactant production; values below 35 mN m<sup>-1</sup> indicate that the microorganism can be considered an efficient biosurfactant producer (Luna et al., 2011). The

surface tension of the biosurfactant produced by the fungus UFSM-BAS-01, after optimization of the culture medium ( $20.08 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ), is lower than those found for *Fusarium* sp. (Qazi et al., 2013) and *F. Proliferatum* (Bhardwaj et al., 2015), which were 32 and  $36.6 \text{ mN m}^{-1}$ , respectively.

Isolate UFSM-BAS-01 was identified by molecular techniques as the fungus *F.fujikuroi* (*Giberellafujikuroi*). This fungus belongs to the species complex *F.fujikuroi*, formerly named the *G.fujikuroi* complex, which is a monophyletic group that largely corresponds to the outdated *Liseola* section but also accommodates species originally classified in other *Fusarium* sections (Geiser et al., 2005). *F.fujikuroi* currently contains more than fifty species, which can be distinguished only by molecular parameters (Rahman et al., 2010).

The environmental variables that most influenced the production of the biosurfactant were temperature and incubation time. Several studies have demonstrated the positive influence of temperatures above  $30^{\circ}\text{C}$  on the production of biosurfactants by microorganisms (Mouafi et al., 2016, Qazi et al., 2014, Vaz et al., 2012). In our study, the biosurfactant with the lowest surface tension was produced with fermentation temperatures above  $37^{\circ}\text{C}$ , although the fungus was isolated and initially cultivated at a temperature of  $30^{\circ}\text{C}$ . Several authors cite  $30^{\circ}\text{C}$  as the ideal temperature for the production of biosurfactants by fungal species (Qazi et al., 2013, 2014). However, the production of biosurfactants at high temperatures, at which microbial metabolism is accelerated, may facilitate the use of these molecules on an industrial scale, including studies on biosurfactants produced from thermophilic microorganisms.

Higher incubation times resulted in higher biosurfactant yields by the fungus *F.fujikuroi* UFSM-BAS-01. Similar results were observed by El-Sheshtawy et al. (2015) and Elazzazy et al. (2015) in the production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* and *Virgibacillus salarius*, respectively. A significant reduction of the biosurfactant tension produced by *F. fujikuroi* ( $20.08 \text{ mN m}^{-1}$ ) was observed after seven days of incubation. Biosurfactants are secondary metabolites that are normally produced during stationary phases, which is likely why the greatest reduction of surface tension occurred only after

seven days of fungal growth. The production of biosurfactants can occur or be stimulated by cell growth under limiting conditions (Vaz et al., 2012).

The agitation variable was statistically significant and had a negative influence on the production of the biosurfactant according to the Plackett-Burman design but was not significant in the central rotational compound design (CCRD). This was probably because the high agitation rates necessary to provide sufficient amounts of oxygen for cultures promote excessive foaming. This intense foaming decreases the yield of the process, as it removes part of the biomass and the substrate from the reaction medium, making it difficult to control the process (Chen et al., 2015).

The ST and critical micellar concentration of the biosurfactant produced by *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 were similar to those of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* YB7, which is capable of reducing the ST of distilled water from 70 to 30 mN m<sup>-1</sup> and has a CMC 40 mg L<sup>-1</sup> (Arutchelvi et al., 2008). In a similar study, Vaz et al. (2012) found a CMC of 40 mg L<sup>-1</sup> for a biosurfactant produced by *B. subtilis* EG1. The CMC of the biosurfactant produced by *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 is similar to that of the synthetic surfactant Findet<sup>®</sup> 1214N/23 (21 mg L<sup>-1</sup>) (Rodríguez et al., 2005). This indicates that the biosurfactant produced by this fungus has the potential for commercial use and that this fungus could be used for the production of biosurfactants on an industrial scale.

The use of a solvent system containing ethyl acetate and methanol enabled the extraction of a disaccharide identified as trehalose (Koto et al., 1980). Until recently, the only form of trehalose that occurred naturally was  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside, with three possible isomers ( $\alpha$ , $\alpha$ -;  $\alpha$ , $\beta$ -; and  $\beta$ , $\beta$ -). In our study, the fungus *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 produced an  $\alpha$ , $\beta$ -trehalose (neo-trehalose), which was recently biosynthesized by other fungi (Morandini et al., 2016). Thus, the present study is the first report of the biosynthesis of an  $\alpha$ , $\beta$ -trehalose by *F. fujikuroi*, suggesting that the biosurfactant produced belongs to the class of trehalolipids. Different types of trehalose-containing glycolipids belonging to the group of mycolates are known to be produced by bacteria such as *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* and *Gordonia* (Lang, Philp, 1998).

Trehalolipids have attracted interest for their potential applications in several areas due to their ability to decrease interfacial tension and increase the pseudosolubility of hydrophobic compounds (Franzetti et al., 2010).

GC-MS analysis of methanol and hexane extracts of the biosurfactant produced by *F. fujikuroi* identified the presence of the lipophilic compound 9-octadecenamide, an oleamide. This lipophilic compound has many biological activities (Cheng et al., 2010). Premjanu et al. (2015) found oleamide to be the major compound in an ethyl acetate extract of *Colletotricum gloeosporioides* fungal biomass. GC-FID hexane extract analysis showed several molecules that can be correlated with a fatty acid pattern, such as caproic acid. However, additional analyses such as MALDI-TOF and FITR are needed to confirm further details about the structure of the biosurfactant.

## Conclusion

- The fungus *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 isolated from soil samples contaminated with hydrocarbons is an efficient biosurfactant producer;
- The production of biosurfactants by *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01 is significantly increased under optimized culture conditions;
- The preliminary identification of the structure of the biosurfactant demonstrates the presence of an  $\alpha,\beta$ -trehalose, suggesting that the biosurfactant belongs to the class of trehalolipids.

## Acknowledgements

The authors thank the Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES) for providing scholarships and financial support of this work.

## References

- [Al-Hatmi AM](#), [van Diepeningen AD](#), [Curfs-Breuker I](#), [de Hoog GS](#), [Meis JF](#) (2015) Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. *J Antimicrob Chemother* 70: 1068–1071.
- Arutchelvi JI, Bhaduri S, Uppara PV, Doble M (2008). Mannosylerythritol lipids: review. *J of Ind Microbiol and Biotechnol* 35: 1559-1570.
- Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK (2015) Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Adv* 5: 54783–54792.
- Cameotra SS, [Makkar RS](#), [Kaur J](#), [Mehta SK](#) (2010) Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv Exp Med Biol* 672: 261–280.
- Chen Q, [Bao M](#), [Fan X](#), [Liang S](#), [Sun P](#) (2013) Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system. *Marine Pollution Bulletin* 71: 269-275.
- Chen WC, Juang RS, Wei YH (2015) Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin produced by microorganisms. *Biochem Eng J* 103: 158–169.
- Cheng M, Ker Y, Yu T, Lin Y, Robert YP, Peng C (2010) Chemical Synthesis of 9(Z)-Octadecenamide and Its Hypolipidemic Effect: A bioactive agent found in the essential oil of mountain celery seeds. *J Agric Food Chem* 58: 1502–1508.
- Divakara ST, [Santosh P](#), [Aiyaz M](#), [Ramana MV](#), [Hariprasad P](#), [Nayaka SC](#), [Niranjana SR](#) (2014) Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *J Sci Food Agric* 94: 1132-1139.
- Elazzazy AM, Abdelmoneim TS, Almaghrabi OA (2015) Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi J of BiolSci* 22: 466-475.
- El-Sheshtawy HS, Aiad I, Osman ME, Abo-ELnasr, Kobisy AS (2015) Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian J of Petroleum*. 24: 155-162.
- Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth TJP, Banat IM (2010) Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European J of Lipid Sci and Technol* 12: 617-627.



- Geiser DM, Lewis Irelly ML, Hakiza G, Juba JH, Miller SA (2005) *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is previously unrecognized member of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Mycologia* 97: 191-201.
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Jain RM, Mody K, Joshi N, Mishra A, Jha (2013) Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108: 199-204.
- Jeon Y, Yu S, Lee YY, Park H, Lee S, Sung JS, Kim Y, Lee H (2013) Incidence, molecular characteristics and pathogenicity of *Gibberella fujikuroi* species complex associated with rice seeds from Asian countries. [Mycobiology](#) 41: 225–233.
- Joice PA, Parthasarathi R (2014) Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1. *Int J of Curr Microbiol and Appl Sci* 3: 140-151.
- Joshi SJ, Geetha SJ, Desai AJ (2015) Characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* R2. *Appl Biochem and Biotechnol* 177: 346-361.
- Koto S, Inada S, Zen S (1980) Upfield shift of cmr of anomeric carbons of 1,1'- linked glycopyranosylglycopyranosides. *Chem Lett* 1: 403-406.
- Lang S, Philp JC (1998) Surface-active lipids in rhodococci. *Anton Leeuw Int J G* 74: 59-70.
- Luna JM, Rufino RD, Albuquerque CD, Sarubbo LA, Campos–Takaki GM (2011) Economic optimized medium for tensio–active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int J of Mol Sci* 12: 2463–2476.
- Mishra U, Paul S, Bandyopadhyaya M (2012) Removal of zinc ions from wastewater using industrial waste sludge: A novel approach. *Environm Program Sustain Energy* 32: 576–586.
- Morandini LM, [Neto AT](#), [Pedroso M](#), [Antoniolli ZI](#), [Burrow RA](#), [Bortoluzzi AJ](#), [Mostardeiro MA, da Silva UF](#), [Dalcol II](#), [Morel AF](#). (2016) Lanostane-type triterpenes from the fungal endophyte *Scleroderma* UFSMSc1 (Persoon) Fries. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett* 16: 1173-1176.

- Mouafi FE, Elsoud MMA, Moharam ME (2016) Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports* 9: 31-37.
- Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within *Gibberellafujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434–458.
- Nitschke N, Pastore GM (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava waste water. *Bioresource Technol* 97: 336–341.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Current Issue* 95: 2044–2049.
- Posada D (2006) Model Test Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34: 700–703.
- Premjanu N, Jaynthy C (2014) Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Lansea corammendalica*. *Int J ChemTech Res* 07: 369-374.
- Qazi MA, [Kanwal T](#), [Jadoon M](#), [Ahmed S](#), [Fatima N](#). (2014) Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8. *Biotechnol Progress* 30: 1065-1075.
- Qazi MA, Subhan M, Fatima N, Ali MI, Ahmed S (2013) Role of biosurfactant produced by *Fusarium* sp. BS-8 in enhanced oil recovery (MEOR) through sand pack column. *Int J of Biosci, Biochem and Bioinf* 3: 598-604.
- Rahman PK, Pasiravi G, Auger V, Ali Z (2010) Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnol and Appl Biochem* 55: 45-52.
- Rodríguez VB, Alameda EJ, Pequena AR, López AIG, Bailón-Moreno R, Aranda MC (2005) Determination of average molecular weight of commercial surfactants: Alkylpolyglucosides and fatty alcohol ethoxylates. *J Surfactants Deterg* 8: 341-346.
- Sawada K (1917) Beitrageüber Formosas-Pilze no. 14. *Trans Nat Hist Soc Formosa* 31: 31–133.

Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Analysing sequences using the Staden package and EMBOSS. *In*. Krawetz, S.A., Womble, D.D. (eds). Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach. Human Press Inc., Totawa, 393–410.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *MolBiol and Evol* 28: 2731–2739.

Vaz DA, Gudiña EJ, Alameda EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2012) Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 89: 167-174.

## 4 DISCUSSÃO

Diferentes tipos de produtos microbianos têm gerado um interesse considerável nos últimos anos devido à sua baixa toxicidade, natureza biodegradável e diversidade, o que os tornam superiores a alguns de seus homólogos químicos (SINGH et al. 2013; SAMADHAN et al. 2014). Entre os produtos microbianos passíveis de serem obtidos, destaca-se a produção de quitinases para a formulação de bioinseticidas.

Tradicionalmente o controle de insetos-praga causadores de perdas nas culturas agrícolas é realizado com agroquímicos. No entanto, devido principalmente aos danos ambientais, medidas alternativas vêm sendo desenvolvidas, destacando-se o controle biológico de insetos a partir de formulações contendo entomopatógenos (bioinseticidas). Embora muitos microrganismos sejam utilizados no controle de pragas da agricultura, os fungos têm sido frequentemente envolvidos em doenças de insetos. Dentre os mais usados, salienta-se os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Nomurea*, *Hirsutella*, *Entomophthor* e *Asckersonia* (MELO; AZEVEDO, 1998).

A espécie *Metarhizium anisopliae* é o fungo mais estudado e produzido em escala comercial no Brasil e seu uso já abrangeu mais de um milhão de hectares tratados, segundo o Instituto Biológico (2015). Entre as principais vantagens da utilização do *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de insetos pragas, está a facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização e, principalmente, o reduzido impacto ambiental. De acordo com Bueno (2010), o fungo *M. anisopliae* vem sendo usado com sucesso para o controle das cigarrinhas das pastagens e de cana-de-açúcar.

Os conídios de *M. anisopliae* são produzidos preferencialmente através de fermentação em estado sólido, dentro de diferentes recipientes conforme a escala e o objetivo da produção (ALMEIDA, 2006). O substrato mais utilizado para a produção desses conídios é o arroz. Isto se deve, provavelmente, devido ao balanço nutricional do grão, custo, ampla disponibilidade mundial, características como tamanho e forma do grão, propriedades de hidratação e integridade estrutural, mesmo após a colonização do fungo (JENKINS et al. 1998). O conhecimento desse

processo de produção do fungo *M. anisopliae* se torna útil e importante para aqueles envolvidos na área de controle biológico via microrganismo (MASCARIN, 2013).

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para uma determinada praga (OTTATI-DE-LIMA, 2007). A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção é muito importante para tornar o controle microbiano de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas (TANZINI, 2002). Devido ao elevado preço do arroz, o custo do substrato para o fungo tem acarretado despesas crescentes aos fabricantes. Por isso, alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos, incluindo resíduos agroindustriais.

Nesse contexto, a otimização da produção de quitinases por *M. anisopliae* utilizando bagaço de cana como substrato surge como uma alternativa promissora para suprir as deficiências no processo industrial de produção de bioinseticidas. No presente trabalho, a condição ideal para aumentar a produção de conídios do fungo *M. anisopliae* produzido através de fermentação em estado sólido com bagaço de cana como substrato foi obtida em temperatura de 33°C, massa de quitina de 0.75g/5g de bagaço e umidade de 60% após 4 dias de incubação. Nessa condição a máxima atividade quitinolítica obtida foi de 6.78 U.g<sup>-1</sup>.

O resultado encontrado no presente estudo está de acordo com outros estudos realizados. Rustiguel et al. (2012) encontraram uma atividade quitinolítica máxima de 7.14 U.g<sup>-1</sup> quando a cepa IBCB 360 de *M. anisopliae* foi incubada por 8-12 dias, com 45-62% de umidade, utilizando crisálidas do bicho-da-seda como substrato. Porém, uma baixa atividade quitinolítica de *M. anisopliae* foi observada quando o fungo foi cultivado em fermentação submersa contendo quitina coloidal como substrato, onde os valores máximos obtidos variaram de 0.525 a 1.560 U.mL<sup>-1</sup>. Em um estudo mais recente, Vijayakumar et al. (2017) também verificaram atividades quitinolíticas inferiores à encontrada em nosso estudo utilizando fermentação submersa, quando *Trichoderma viride*, *Metarhizium anisopliae* e *Candida albicans* apresentaram os valores 2.75, 2.51 e 2.23 U.mL<sup>-1</sup> de quitina coloidal, respectivamente.

Desse modo, o resultado do presente estudo poderá contribuir para o avanço na utilização de quitinases para a formulação de inseticidas e sua produção em escala industrial, utilizando resíduos agroindustriais abundantes na natureza e de

baixo custo, como o bagaço de cana. Visto que a produção de quitinases extracelulares é influenciada principalmente por micro e macronutrientes e pelo substrato fornecido. Além disso, geralmente a produção de quitinases é realizada utilizando-se fermentação submersa contínua ou alimentada, o que comprovadamente não leva à obtenção de atividades quitinolíticas satisfatórias. No entanto, a possibilidade de produzir quitinases utilizando bagaço de cana como substrato em fermentação em estado sólido, pode reduzir o custo de produção e facilitar diversas etapas do bioprocessamento.

Entre os produtos microbianos de uso industrial, destacam-se os tensoativos anfifílicos – biossurfactantes, que apresentam uma série de aplicações na indústria de medicamentos, cosméticos, petróleo e detergentes, na biorremediação de solos contaminados e também na agricultura, principalmente na formulação de herbicidas e pesticidas (GEYS et al. 2014; REBELLO et al. 2014). Em geral, os tensoativos químicos são preferidos em escala industrial, principalmente devido ao custo mais baixo em comparação com os biossurfactantes. No entanto, recentemente, há uma tendência mundial para a produção de biossurfactantes em escala industrial, devido à disponibilidade de substratos mais baratos para a sua produção e também por uma crescente conscientização a respeito das vantagens acerca de seu menor impacto sobre o ambiente (GUDINÃ et al. 2015)

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir esses compostos. Apesar dos biossurfactantes terem sido descobertos primeiro como compostos extracelulares da fermentação de bactérias, eles também podem ser produzidos por leveduras e fungos filamentosos (SILVA et al. 2014). Estes microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes através de processos fermentativos utilizando diversos substratos, incluindo açúcares, óleos, alcanos e resíduos (HAZRA et al. 2015). Diversas bactérias e relativamente poucos fungos foram estudados utilizando fontes renováveis para a produção de biossurfactantes (SATPUTE; BANAT, 2010).

A otimização do bioprocessamento a partir da variação das condições de cultivo é um aspecto importante, pois qualquer pequena alteração pode induzir à modificação do biossurfactante resultante. Uma série de fatores físico-químicos influencia na produção do biossurfactante. Em nosso estudo, o fungo *Fusarium fujikuroi* foi isolado a partir de solos contaminados com hidrocarbonetos, sua habilidade de produzir biossurfactante foi avaliada através da tensão superficial. Quando cultivado em meio contendo glicose como fonte de carbono, a condição otimizada através da

metodologia da superfície de resposta (MSR) que apresentou a menor tensão superficial de  $20.08 \text{ mN.m}^{-1}$  foi a temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$ , 190 rpm de agitação e período de incubação de 7 dias.

A fonte de carbono desempenha um papel importante no crescimento e também na produção de biossurfactantes por diversos microrganismos. Kiran et al. (2009) relataram que a suplementação de glicose como fonte de carbono aumentou em 35% a produção de um biotensioativo pelo fungo *Aspergillus ustus*. No estudo conduzido por Mouafi et al. (2016), a máxima produção de biossurfactantes por *Bacillus brevis* ocorreu com a utilização da máxima concentração (8,5%) de glicose. A produção de biossurfactantes também é afetada por variáveis como pH, temperatura, período de incubação e velocidade de agitação. Korayem et al. (2015) estudaram a produção de um biossurfactante por *Streptomyces*, o maior índice de emulsificação (42%) foi obtido com pH 6.0, temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$ , agitação de 150 rpm e período de incubação de 3 dias. Já no estudo conduzido por Bueno et al. (2010), a melhor condição de produção de um biossurfactante por *Bacillus pumilus* foi obtida com pH entre 5.0 e 7.0, com 72 h de fermentação, havendo nessa condição maiores porcentagens de índice de emulsificação e também melhores reduções da tensão superficial.

As classes de biossurfactantes mais produzidas pelos microrganismos são representadas por glicolipídeos e lipopeptídeos. Os glicolipídeos são normalmente mono- ou dissacarídeos acilados, com longas cadeias de ácidos graxos e apresentam como subclasses, os sofrólipídeos, os trealolipídeos e os ramnolipídeos. Os ramnolipídeos são produzidos por diferentes espécies de *Pseudomonas* (HASSAN et al. 2016), os sofrólípidos são sintetizados por diferentes espécies da levedura *Candida* (SAMAD et al. 2017) e os trealolípídeos são encontrados em *Rhodococcus* e outros actinomicetos (SURYANTI et al. 2016). Os lipopeptídeos são produzidos por várias espécies de *Bacillus*. Particularmente por *Bacillus subtilis* que produz a surfactina, um lipopeptídeo cíclico considerado o biossurfactante mais ativo descoberto até agora (RAMIREZ et al. 2016). No entanto, ainda há uma grande lacuna de conhecimento acerca da produção e classificação de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos.

Em geral, a maioria dos trabalhos envolvem a produção de biossurfactantes com propriedades antimicrobianas por espécies de *Bacillus* para serem aplicados contra microrganismos patógenos do gênero *Fusarium* sp. (GOSWAMI et al. 2014,

DEEPAK; JAYAPRADHA, 2015). Poucos trabalhos abordam a produção de biossurfactantes por microrganismos do gênero *Fusarium* sp. e mais escassos ainda são os trabalhos que visam sua aplicação na área agrícola. Até o momento apenas dois trabalhos foram publicados utilizando fungos do gênero *Fusarium* para a produção de biossurfactantes, em um deles *Fusarium proliferatum* produziu um biossurfactante com tensão superficial de  $36.6 \text{ mN m}^{-1}$  a partir de farelo de arroz (BHARDWAJ et al. 2015). No trabalho conduzido por Qazi et al. (2013) a cepa *Fusarium* sp. BS-8 produziu um biossurfactante, cuja estrutura não foi identificada. O mesmo apresentou tensão superficial de  $32 \text{ mN m}^{-1}$  e potencial para ser utilizada na recuperação de áreas contaminadas com óleo. Em um trabalho conduzido por Lima et al. (2016), uma cepa de *Fusarium* sp. isolada no Amazonas/Brasil não foi capaz de produzir biossurfactantes utilizando diferentes fontes de carbono.

Além da produção de biossurfactantes por esses fungos ser destinada para uma finalidade diferente da proposta em nosso trabalho, cujo objetivo foi utilizar o biossurfactante como adjuvante na formulação de inseticidas e herbicidas, pode-se verificar que a tensão superficial obtida é bem mais alta do que a apresentada pela cepa UFSM-BAS-01 de *F. fujikuroi*. Desse modo, a tensão superficial de  $20.08 \text{ mN.m}^{-1}$  obtida em nosso estudo foi muito satisfatória e superou a capacidade da redução da tensão superficial da surfactina, a qual é capaz de reduzir a tensão superficial da água destilada de 72 para  $27 \text{ mN.m}^{-1}$  (COOPER et al. 1981).



## 5 CONCLUSÃO

A produção da quitinase pelo fungo *Metharizium anisopliae* foi otimizada em meio de fermentação sólido contendo bagaço de cana como substrato. Através de um delineamento composto central rotacional foi avaliada a influência das variáveis quantidade de quitina, temperatura e umidade, resultando em uma atividade quitinolítica máxima de  $6.78 \text{ U g}^{-1}$ , indicando que há possibilidade de aumentar a escala de produção de quitinases em biorreatores.

A partir de solos contaminados com hidrocarbonetos isolou-se a cepa *Fusarium fujikuroi* UFSM-BAS-01, a qual apresentou potencial para a produção de biossurfactantes de acordo com a análise da massa seca, índice de emulsificação e tensão superficial. A partir de um delineamento Plackett-Burman as variáveis significativas para a produção do biossurfactante foram selecionadas para a realização um delineamento composto central rotacional. A temperatura de  $47^\circ\text{C}$ , agitação de 120 rpm e período de incubação de 7 dias foi a condição otimizada para a produção do biossurfactante por *F. fujikuroi* utilizando glicose como substrato. O substrato apresentou uma CMC similar a de surfactantes químicos comerciais, apresentando um valor de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ , o qual proporcionou a redução da tensão superficial da água destilada de 72 para  $27 \text{ mN.m}^{-1}$ . A identificação preliminar da estrutura do biossurfactante através de ressonância magnética nuclear do  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  evidenciaram a presença de uma  $\alpha,\beta$ -trealose, sugerindo que o biossurfactante pertença à classe dos trealolípideos.

## REFERÊNCIAS

- ABUDULAI, M., SHEPARD, B.M., MITCHELL, P.L. Parasitism and predation on eggs of *Leptoglossus phyllopus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) in Cowpea: impact of endosulfan sprays. **J. Agr. Urban Entomol.** v. 18, p. 105-115, 2001.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.B. **Microorganismos no controle de pragas.** In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D. T. Controle Biológico de pragas: na prática. Cap. 3, p.35- 44. Piracicaba: CP2, 2006.
- ANVISA. **Agrotóxicos à base de cihexatina serão banidos do Brasil.** <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/170609\\_1.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/170609_1.htm)>. Acesso em 20 mar. 2012.
- ARAKANE, Y., MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular Molecular Life Sciences.* v. 67, p. 201-216, 2010.
- AWADA, S.M., AWADA, M., SPENDLOVE, R.S. 2011. **Method of controlling pests with biosurfactant penetrants as carriers for active agents.** US. Patent No. 2011/0319341 A1.
- BAI et al. Cuticle degrading enzyme production by some isolates of the entomopathogenic fungus, *metarhizium anisopliae* (metsch.). **J. Bio-Sci.** v. 20, p. 25-32, 2012.
- BANAT et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87, p. 427–444, 2010.
- BHARDWAJ, G., CAMEOTRA, S.S., CHOPRA, H.K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. **RSC Adv.** v.5, 54783–54792, 2015.
- BHATTACHARYA, D., NAGPURE, A., GUPTA, R.K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology.** v. 27, n. 1, p. 21–28, 2007.
- BINOD et al. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. **J. Appl. Microbiol.** v. 103, p. 1845–1852, 2007.
- BRITO et al. The Pangenome of the *Anticarsia gemmatilis* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Genome, Biology and Evolution.** v. 8, p. 94-108, 2015.
- BUENO, S.M., DA SILVA, A.N., GARCIA-CRUZ, C.H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quim.Nova.** v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

- CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr.Opin.Microbiol.** v. 7. p. 262-266, 2004.
- CARVALHO et al. Efficiency of neem oil nanoformulations to *Bemisia tabaci* (GENN.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Semina.** v. 33, n. 1, 2012.
- CHANDLER et al. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Phil.Trans. R. Soc. B.** v. 366, p. 1987-1998, 2011.
- CHANDRASEKARAN et al. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochem.and Physiology.** v. 104, p. 65–71, 2012.
- CHEOWTIRAKUL, C., LINH, N.D. The study of Biosurfactant as a Cleaning Agent for Insecticide Residue in Leafy vegetables. **Assumption University: Journal of Technology.** v. 14, p. 75-87, 2010.
- DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chem.** v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.
- DEEPAK, R., JAYAPRADHA, R. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. **J. of Medical Mycol.** v. 25, p. 15-24, 2014.
- DESAI, J.D. BANAT, I.M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* v. 61, p. 47-64, 1997.
- DRISS et al. Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal crystal. **Curr.Microb.** v.62, p. 281-288, 2010.
- EL-SAYED et al. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol.** v. 54, p. 394–403, 1989.
- EL-SAYED et al. Potential of 'lure and kill' in long-term pest management and eradication of invasive species. **J. Econ. Entomol.** v. 102, p. 815–835, 2009.
- FARIA, M.R., WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biol. Control.** v.43, p. 237 –256, 2007.
- FORMENTI, L. **Agrotóxico endosulfan será banido no Brasil em 2013: demora é criticada.** <<http://www.estadao.com.br/noticias/impreso.agrotoxico-endosulfan-sera-banido-no-brasil-em-2013-demora-e-criticada,581365,0.htm>>. Acesso em 01 out. 2012.
- GEYS, R., SOETAERT, W., VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Curr.Opin.Biotechnol.** v. 30, p. 66–72, 2014.

GHRIBI et al. Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. **J. of Stored Products Research**.v. 48, p. 68-72, 2012.

GISSLER-BLANCK et al. 2012.**Use of sophorolipids and derivatives thereof in combination with pesticides as adjuvant/additive for plant protection and industrial non crop field.** US Patent No. 2012/0220464 A1.

GOMAA, E.Z. Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol. **The J. of Microb.** v. 50, p. 103–111, 2012.

GRUBER et al. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species.**Appl. Environ. Microb.** v. 77, p. 7217–7226, 2013.

GRUBER, S. et al. Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*.**Glycobiology**.v. 21, p. 122–133, 2011.

GUDIÑA, E. J., RANGARAJAN, V., SEN, R., RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacol.Sci**.v. 34, p. 667-675, 2013.

HAMZAH, A., SABTURANI, N. AND RADIMAN, S. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria.**Sains Malays**. v. 42, p. 615-623, 2013.

HASSAN et al. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. **Int. J. Biol. of Macromol**.v.82 p. 573-579, 2016.

HAZRA, C., KUNDU, D., CHAUDHARI, A. **RSC Adv**.Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii*BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. v. 5, p. 2974–2982, 2015.

HAO et al. Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated *Chitolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. **Brazilian J. of Microb**.v.1, p. 177-186, 2012.

HART et al. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. **J. of Mol. Biology**. v. 248, n. 2, p. 402–413, 1995.

HARTL, L., ZACH, S., SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Appl. Microb.and Biotechnol**. v. 93, n. 2, p. 533–543, 2012.

- HENRISSAT, B., BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem.J.** v. 293, p. 781–788, 1993.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem.J.** v. 316, p. 695–696, 1996.
- ISHAQ et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. **J. Appl. Microbiol.** v. 119, p. 1035-1045, 2015.
- JAIN et al. Produção e caracterização estrutural de biossurfactantes produzido por uma bactéria alcalifílica *Klebsiella* sp.: Avaliação de diferentes fontes de carbono. **Colloid.and Surf.B: Biointerfaces.** v. 108, p. 199-204, 2013.
- JAVAR et al. Expression of pathogenesis-related genes in *Metarhizium anisopliae* when infecting *Spodoptera exigua*. **Biol. Control.** v. 85, p. 30–36, 2015.
- JENKINS et al. **Visualization of Specific B and T Lymphocyte Interactions** in: The Lymph Node. Science 3 July 1998: Vol. 281 no. 5373 pp. 96-99.
- JOICE, P.A., PARTHASARATHI, R. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1. **Int. J. Curr. Microb. Appl. Sci.** v. 3, n. 9, p.140-151, 2014.
- JUNG, W., PARK, R. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. **Marine Drugs.** v.12, p. 5328-5356, 2014.
- KARLSSON, M., STENLID, J. Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. **J. Mol. Microb. Biotechnol.** v. 16, p. 208–223, 2009.
- KARTHIK, N., AKANKSHA, K., PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases – A review. **Indian J. of Exp. Biol.** v. 52, p. 1025-1035, 2014.
- KERSHAW et al. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **J. Invertebr. Pathol.** v. 74, 213–223, 1999.
- KIM et al. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). **J Agric. Food Chem.** v. 59, p. 934–938, 2011.
- KIRAN et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloid.and Surf. B: Biointerfaces,** v. 73, p. 250–256, 2009.
- KORAYEM A.S., ABDELHAFEZ A.A., ZAKI M.M., SALEH E.A. Optimization of biosurfactant production by *Streptomyces* isolated from Egyptian arid soil using Plackett–Burman design. **Ann. Agric. Sci.** v. 60, p. 209–217, 2015.

- KOSARIC, N., SUKAN, F.V. **Biosurfactants Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics**. CRC press, London, New York. 2014. 389p.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnol.** v. 8, p. 203–226, 2006.
- KURTZMAN, C.P. *Candida kuoi* sp. nov., an anamorphic species of the *Starmerella* yeast clade that synthesizes sphingolipids. **Int. J. Syst. Evol. Micr.** v. 62, p. 2307-2311, 2012.
- LANG S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.** v. 7, p. 12–20, 2002.
- LANGER et al. Production and modification of bioactive biosurfactants. **Process. Biochem.** v. 41, p. 2138-2145, 2006.
- LARIBI-HABCHI et al. Efficacy of crude and purified chitinases (sschi50) extracted from offal red scorpion fish in biological control of chickpea weevil (*Callosobruchus maculatus* L.). **J. of Food Process. and Preservation.** v. 39, p. 1355-1360, 2015.
- LEEMON, D.M., JONSSON, N.N. Comparison of bioassay responses to the potential fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Lucilia cuprina*. **Veterinary Parasitol.** v. 185, p. 236–247, 2012.
- LEEMON, D.M., JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **J. of Invertebr. Pathology.** v. 97, p. 40–49, 2008.
- LI et al. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their success using entomopathogenic fungi. **Biocontrol. Sci. Technol.** v. 20, p. 117–136, 2010.
- LIANG et al. Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 63, p. 8-14, 2014.
- LIMA et al. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. **African J. of Biotechnol.** v. 15, p. 1217-1223, 2016.
- LIN, S.C. Biosurfactant: recent advances. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 63, p. 109–20, 1996.
- MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express** v. 1, p. 5–24, 2011.
- MAO et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **J. Hazard. Mater.** v. 285, p. 419–435, 2015.

MARCHANT R, BANAT IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Biotechnol Letters**.v.34, p.1597-1605, 2012.

MASCARIN, G.M. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biol. Control**. v.66, p. 209-218, 2013.

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA–CNPMA, 1998. 264p.

MISHRA, U., PAUL, S., BANDYOPADHAYA, M. Removal of zinc ions from wastewater using industrial waste sludge: A novel approach. **Environmental Program Sustainable Energy**. v. 32, p. 576–586, 2012.

MNIF, I., GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**. v. 77, p. 52-64, 2015.

MORITA et al. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. v. 75, p. 1371-6, 2011.

MOUAFI et al. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**.v.9, p. 31-37, 2016.

MULLIGAN, C.N.; Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollut**. v. 133, p. 83-198, 2005.

MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Eng. Geol**. v. 60, p. 371-380, 2001.

NGUYEN et al. Chitinase from *Bacillus licheniformis* DSM13: Expression in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and biochemical characterization. **Protein Expression and Purification**. v. 81, p. 166-174, 2012.

NI, H. et al. Molecular Docking and Site-directed Mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* Chitinase to Improve Chitinolytic, Synergistic Lepidopteran-larvicidal and Nematicidal Activities. **Int.J. Biol. Sci**. v. 11, p. 304-315, 2015.

OTTATI-DE-LIMA, E.L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entopamopatô- genos**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP, Botucatu, 2007.

PACWA-PŁOCINICZAK et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **Int. J. Mol. Sci**. v. 12, p. 633–654, 2011.

PAL et al. Media optimization for biosurfactant production by versus a statistical approach *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, p. 747-756, 2009.

PATIL, N.S., JADHAV, J.P. Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. **Chemosphere**.v.128, p. 231–235, 2015.

PETERS, W. In: Bradshaw, S.D., Burggeren, W., Heller, H.C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall, D.J. (Eds.), **Zoophysiology: Perotrophic Membranes**, 130. Chemical Composition. Springer-Verlag, Berlin, 1992.

POLAR et al. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental and Appl. Acarology**. v. 46, p. 119–148, 2008.

PORNSUNTHORNTAWEE et al. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochem.Engineer.J.** v.42, p. 172–179, 2008.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiol.** 5th edition. The McGraw-Hill Companies, 2002, 1139 p.

PRICE, N.P.J., RAY, K.J., VERMILLION, K.E., DUNLAP, C.A., KURTZMAN, C.P., Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. **Carbohydr.Res.** v. 348, p. 33-41, 2012.

QAZI, M.A., KANWAL, T., JADOON, M., AHMED, S. Isolation and Characterization of a Biosurfactant-Producing *Fusarium* sp. BS-8 from Oil Contaminated Soil. **Biotechnol.Prog.** v. 30, n.5, 2014.

QAZI, M.A., SUBHAN, M., FATIMA, N., ALI, M.I., AHMED, S. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp. BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. International Journal of Bioscience, **Biochem.and Bioinform.** v. 3, n. 6, 2013.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

QUÍMICA VERDE NO BRASIL: 2010-2030. Brasília, DF. Centro de Gestão de Estudos Estratégicos, 2010, 438 p.

RAMIREZ et al. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technol.** v. 205, p. 1-6, 2016.

RATHORE, A.S., GUPTA, R.D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzym.Research.** v. 2015, p. 1-9, 2015.



REBELLO et al. Surfactants: toxicity, remediation, and green surfactants. **Environ. Chem. Lett.** v. 12, p. 275–287, 2014.

REDDY, G.V.P., CRUZ, Z.T., GUERRERO, A. Development of an efficient pheromone-based trapping method for the banana root borer *Cosmopolites sordidus*. **J. Chem. Ecol.** v. 35, 111–117, 2009.

RODRIGUEZ et al. Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: in vitro portion expression after intravenous administration. **Int. J. Pharm.** v. 385, p. 157–162, 2010.

ROSAS-GARCÍA, N.M., FORTUNA-GONZÁLEZ, J.M., BARBOZA-CORONA, E. Characterization of the chitinase gene in *Bacillus thuringiensis* Mexican isolates. **Folia Microbiologica.** v. 58, p. 483-490, 2013.

SAHARAM, B.S., SAHU, R.K., SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnol.J.** v. 2011, 2011.

SAMAD et al. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. **J. of Ind. Microbiol & Biotechnol.** v. 44, p. 353-362, 2017.

SANTOS et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21<sup>st</sup> Century. International Journal of Molecular Sciences. **Int. J. Mol. Sci.** v.17, p. 401, 2016.

SATPUTE et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnol. Adv.** v.28, p. 436-450, 2010.

SCHADEV, D.P., CAMEOTRA, S.S. Biosurfactants in agriculture. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** v. 97, p. 1005-1016, 2013.

SILVA et al. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **Int. J of Mol. Sci.** v. 15, p. 12523-12542, 2014.

SILVERIO et al. Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. **Pest Manag. Sci.** v. 65, p. 900–905, 2009.

SINGH, S.P., BHARALI, P., KONWAR, B.K. Optimization of nutrient requirements and culture conditions for the production of rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) using Mesua ferrea seed Oil, Indian. **J. Microbiol.** v. 53, p. 467–476, 2013.

SLIVINSKI et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochem.** v. 47, p. 1848-1855, 2012.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technol.** Second Edition. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, 357 p.

SOLANKI, J.N., MURTHY, Z.V.P. Highly monodisperse and sub-nano silver particles synthesis via microemulsion technique. **Colloid.Surf.A Physicochem.Eng. Aspects**.v.359, p. 31–38, 2010.

SUMA, K., PODILE, A.R. Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. **Bioresour.Technol.** v. 133, p. 213–220, 2013.

SURYANTI, V., HASTUTI, S., ANDRIANI, D. Optimization of biosurfactant production in soybean oil by rhodococcus rhodochrous and its utilization in remediation of cadmium-contaminated solution. **Materials Sci. and Engineering** v. 107, p. 12-18, 2016.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use.**Ind. Biotechnol.** v. 23, p. 192-208, 2006.

TRELLU et al. Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review. **J. of Hazardous Materials.** v. 306, p. 149-174, 2016.

VAN MUNSTER et al. Biochemical characterization of *Aspergillus niger* Cfcl, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. **Microbiol.**v. 158, p. 2168-2179, 2012.

VIJAYAKUMAR, N., ALAGAR, S., MADANAGOPAL, N. Biocontrol potential of fungal chitinase from high yielding *Trichoderma viride* against *Corcyra cephalonica* (Stainton).**Int. J. Pharm. Bio.Sci.** v. 8, p. 447-452, 2017.

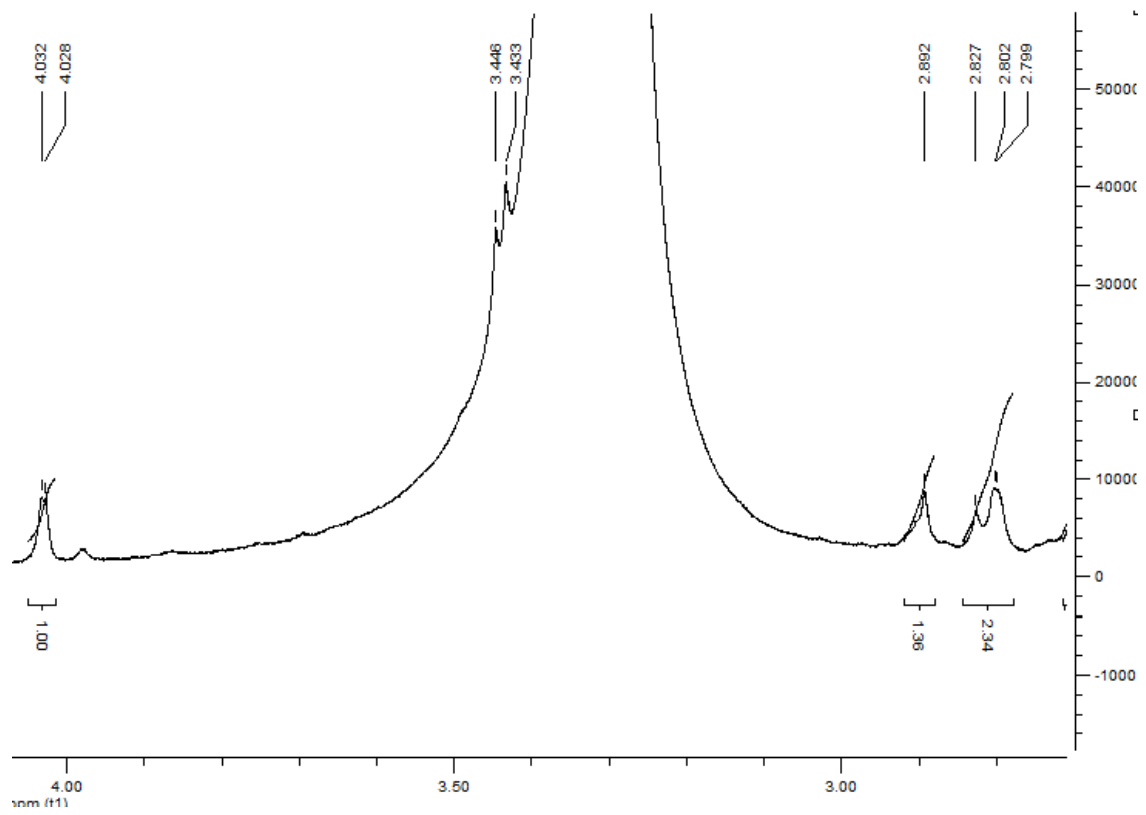
WAGHMODE et al. Low-cost production of biosurfactant from different substrates and their comparative study with commercially available chemical surfactant.**Int. J. Sci. Technol. Res.** v.3, p. 146–149, 2014.

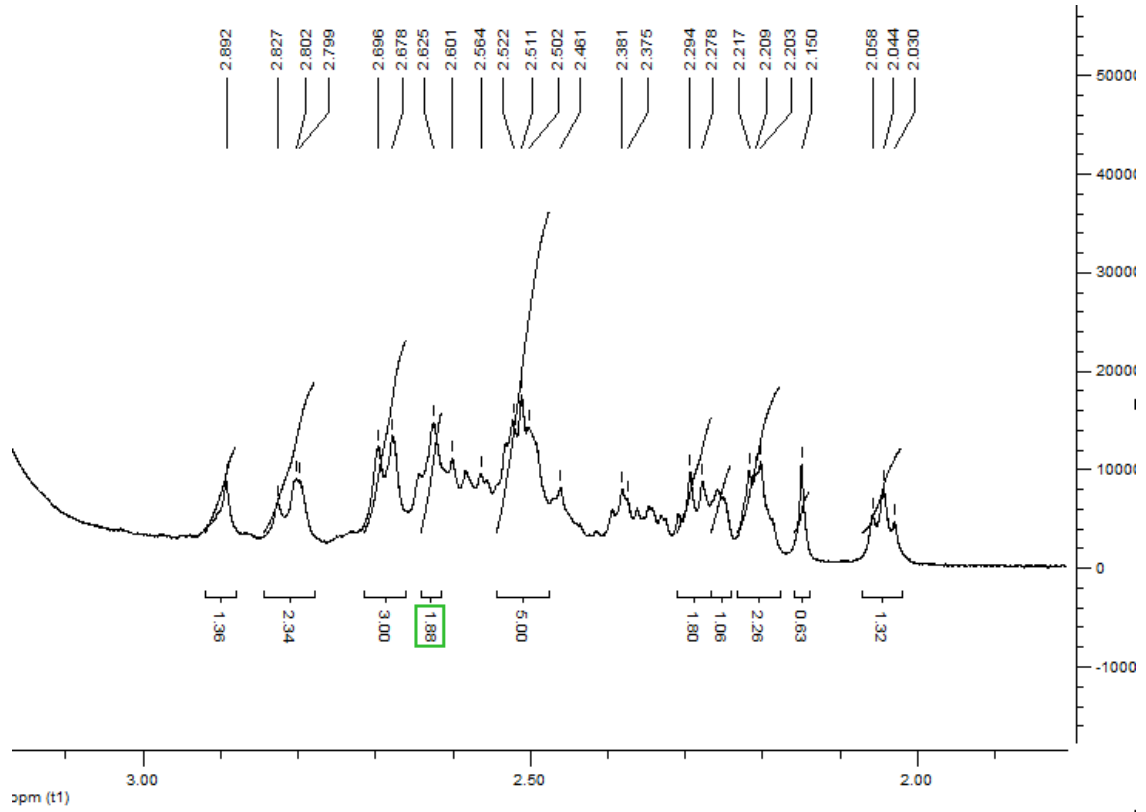
WASLI et al. Medium Optimization for Chitinase Production from *Trichoderma virens* using Central Composite Design. **Biotechnol.Bioprocess.Eng.**v.14, p. 781-787, 2009.

WATTANAPHON et al. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization.**J. Appl. Microbiol.** v. 105, p. 416–423, 2008.

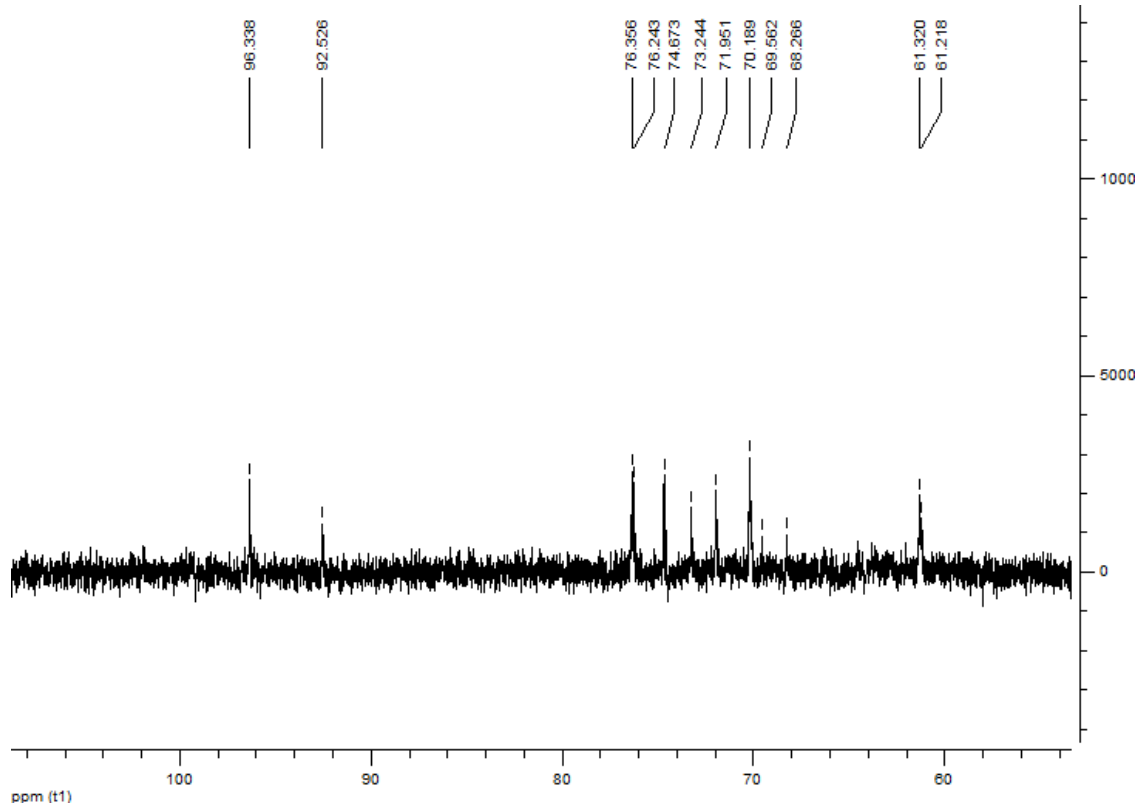
WITZGALL et al. Codling moth management and chemical ecology.**Annu. Rev. Entomol.** v. 53, p. 503–522, 2008.

## ANEXO A – MATERIAL SUPLEMENTAR REFERENTE AO ARTIGO 2

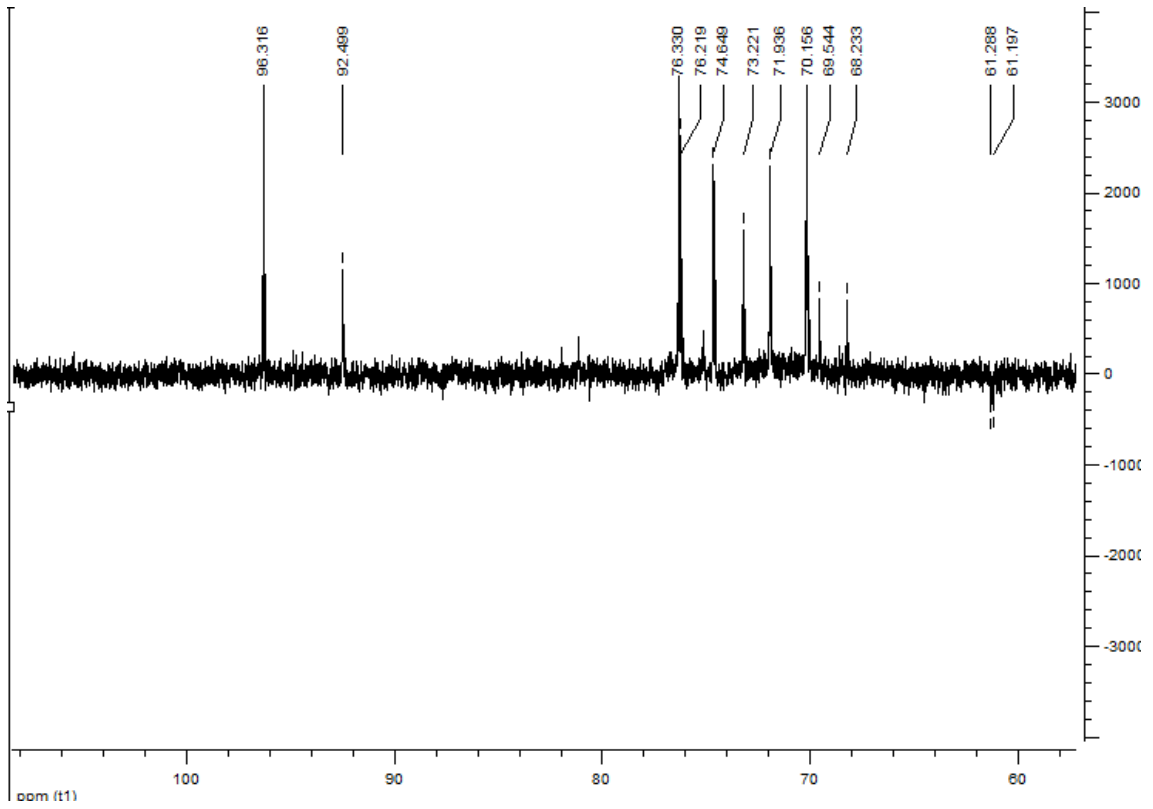
Anexo A1. Espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto trealose em MeOH a 600 Hz.



Anexo A2. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do metabólito trealose em MeOH, a 600 MHz.



Anexo A3. Espectro RMN do  $^{13}\text{C}$  do metabólito trealose em MeOH a 600 MHz.



Anexo A4. Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito trealose em MeOH a 600 MHz